



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII)



***Implicación de aralar/AGC1/Slc25a12, el transportador
mitocondrial de aspartato-glutamato, y su dependencia funcional de Ca^{2+}
en el metabolismo de la glucosa responsable de la secreción de insulina
en la célula- β***

Memoria presentada por la licenciada

Patricia Mármol Carrasco

para optar al grado de Doctor en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de Tesis:

Dra. Jorgina Satrústegui Gil-Delgado

Dra. Beatriz Pardo Merino

Madrid, Octubre de 2009

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Doctora Jorgina Satrústegui Gil-Delgado, Catedrática del Departamento de Biología Molecular/ Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Este laboratorio está integrado en el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (Ciberer-ISCIII). Parte de este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Profesor Claes Wollheim, en la Universidad de Ginebra (Suiza), mediante la realización de una estancia breve financiada por la beca FPI de la Comunidad de Madrid.

Índice

Índice de figuras	11
Índice de tablas	14
Abreviaturas	17
Summary	23
Introducción	27
1. La mitocondria	27
1.1. Transportadores mitocondriales	27
1.1.1. Características generales	27
1.1.2. Características estructurales de la familia SLC25	29
1.1.3. Transportadores mitocondriales que unen Ca^{2+} . Familia CaMC	30
1.1.4. Aralar	31
1.1.4.1. Ratones deficientes en <i>Aralar</i>	32
1.1.4.2. Estados patológicos en humanos relacionados con defectos en aralar-MAS	33
1.1.5. Citrina	34
1.2. Regulación por Ca^{2+} del metabolismo mitocondrial	34
1.2.1. Uniportador de Ca^{2+} y deshidrogenasas mitocondriales	34
1.2.2. Regulación por Ca^{2+} de la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS)	35
2. La célula- β	36
2.1. Señalización por glucosa y secreción de insulina	36
2.1.1. Reconocimiento y metabolismo de la glucosa en la célula- β	37
2.1.2. Metabolismo mitocondrial del piruvato	39
2.1.3. Papel del Ca^{2+} en la activación mitocondrial. Fase de amplificación de GSIS	40
2.1.4. Anaplerosis y reciclaje del piruvato en la célula- β	41
2.1.5. Acción de la glucosa independiente de los canales $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$	41
2.2. Líneas celulares como modelos de estudio de la célula- β	41
2.3. Modelos de Diabetes tipo 2 por lipotoxicidad (glucolipotoxicidad) en la	

célula- β .	42
Objetivos del trabajo	47
Materiales y métodos	51
1. Construcción de vectores	51
1.1. Disminución de los niveles de aralar mediante shRNAs	51
1.1.1. Elección de secuencias	51
1.1.2. Vectores para transfecciones transitorias	52
1.1.3. Vectores para transfecciones estables	54
1.2. Reconstitución de aralar en células aralar KD	54
1.3. Reconstitución de aralar mutado en células aralar KD	55
2. Separación de las células GFP ⁺ mediante FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).	55
3. Cultivos celulares y transfecciones	55
3.1. Células HEK 293	55
3.2. Células INS-1	55
4. Western blots	56
5. Aislamiento de mitocondrias a partir de células INS-1	57
6. Reconstitución de la lanzadera de NADH malato-aspartato	58
7. Calibración de Ca ²⁺ libre	58
8. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	59
9. Ensayo de secreción de insulina	59
10. Medidas mediante técnicas de imaging de Ca ²⁺ citosólico ([Ca ²⁺] _i) en células INS-1	60
11. Medidas de Ca ²⁺ mitocondrial ([Ca ²⁺] _m) en células INS-1	60
11.1. Adenovirus recombinantes que codifican mt-Aequorina	60
11.2. Infección de células INS-1 con rAd mt-Aequorina	60
12. “Imaging” (o imagen) de NAD(P)H mitocondrial por microscopía de dos-fotones	62
13. Oxidación de glucosa y piruvato	62
14. Animales	63

14.1.	Mantenimiento de la colonia de aralar	63
14.2.	Genotipado de ratones deficientes en aralar	64
14.3.	Medida de la ingesta en ratones <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	64
14.4.	Estudio de la administración de dieta grasa en ratones <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	64
14.4.1.	Composición de la dieta administrada a los ratones y medida de la ganancia de peso	64
14.4.2.	Test de tolerancia a glucosa (GTT) en ratones <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	65
14.4.3.	Medida de la insulina en plasma	65
15.	Análisis Estadístico	65
	Resultados	69
1.	Generación de líneas estables derivadas de la línea INS-1	69
1.1.	Diseño de shRNAs para disminuir los niveles de aralar	69
1.2.	Disminución de los niveles de aralar mediante RNAi en células INS-1	72
1.3.	Reconstitución de la expresión de aralar nativo en células INS-1	73
1.4.	Mutagénesis de los motivos EF de aralar	75
1.5.	Reconstitución de la expresión de aralar mutado en células INS-1	75
2.	Medida de la actividad MAS en mitocondrias de células INS-1 aralar KD	77
2.1.	Efecto del aspartato en la reconstitución de la actividad MAS	77
2.2.	Reconstitución de la actividad de la lanzadera en ausencia de aspartato	78
3.	Efecto de aralar KD en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	78
4.	Efecto de aralar en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria inducida por glucosa	80
5.	Efecto de aralar KD en la secreción de insulina inducida por glucosa (GSIS)	82
6.	Activación por Ca^{2+} de la lanzadera de NADH malato-aspartato en mitocondrias aisladas	83
6.1.	Activación por Ca^{2+} de la lanzadera en presencia de Rojo de Rutenio	84
6.2.	Activación por Ca^{2+} de la lanzadera en ausencia de Rojo de Rutenio	84
6.3.	Papel de los motivos EF de aralar en la activación por Ca^{2+} de la lanzadera	84
7.	Generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa	86

7.1.	Generación de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa en ausencia de Ca^{2+} extracelular	87
7.2.	Generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa en presencia de Ca^{2+} extracelular. Papel del Ca^{2+} citosólico y mitocondrial	89
8.	Oxidación de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[\text{1}-^{14}\text{C}]$ piruvato en células Wt 24 y aralar KD	93
9.	Papel de los motivos EF de aralar en la secreción de insulina inducida por glucosa	94
10.	Efecto de la dieta grasa en ratones <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	97
10.1.	Efecto en la ganancia de peso	99
10.2.	Efecto en la tolerancia a glucosa y en la secreción de insulina	100
11.	Supervivencia de ratones <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	108
	Discusión	113
1.	Deficiencia de <i>Aralar</i> en la célula- β	113
1.1.	Papel del glutamato en la célula- β	114
1.2.	Efectos del reciclaje del piruvato sobre la vía aralar-MAS	117
2.	Regulación por Ca^{2+} de aralar	119
2.1.	La vía Aralar-MAS en células intactas tiene un requerimiento absoluto de Ca^{2+}	119
2.2.	Se requieren señales de Ca^{2+} citosólicas para acoplar la actividad de MAS a la utilización de glucosa	120
3.	Potenciación de GSIS por agonistas purinérgicos	121
4.	Efectos en la homeostasis de la glucosa en ratones con deficiencia parcial de aralar	122
4.1.	Particularidades de la cepa y del género.	122
4.2.	Efecto de una dosis de <i>Aralar</i> en el fondo C57BL/6xSv129	124
	Conclusiones	129
	Referencias	133
	Anexos	

Índice de figuras

Figuras Introducción

Figura 1. La familia de los transportadores mitocondriales	28
Figura 2. Estructura general de los transportadores mitocondriales	29
Figura 3. Esquema de la estructura secundaria de los CaMCs	31
Figura 4. Motivos EF en aralar	32
Figura 5. Regulación por Ca^{2+} de MAS y vía CaU-mitDH	35
Figura 6. Modelo (canónico) de secreción de insulina en la célula- β . Papel de las lanzaderas en GSIS	37
Figura 7. Lanzadera de glicerol-fosfato	38

Figuras Materiales y métodos

Figura 8. Silenciamiento mediante RNA de interferencia (RNAi)	51
Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de aralar para ratón, rata y humano	52
Figura 10. Vectores empleados para transfecciones en células HEK 293. Estructura de la horquilla shRNA	53
Figura 11. Vectores empleados para la generación de líneas estables a partir de células INS-1	54
Figura 12. Esquema general del proceso de aislamiento mitocondrial	57
Figura 13. Reconstitución de MAS	58
Figura 14. Reacción de emisión de luz en células que expresan mt-Aequorina	61
Figura 15. Generación y genotipado de animales deficientes en <i>Aralar</i>	63

Figuras Resultados

Figura 16. Procedimiento experimental seguido con el RNAi y en el rescate de la expresión de aralar nativo y mutado	70
---	----

Figura 17. Eficiencia de los diferentes <i>cassettes</i> shRNA para disminuir los niveles de proteína aralar en la línea celular HEK 293 pIRES <i>aralar</i> 1	71
Figura 18. Expresión de aralar, citrina y otros marcadores en las células HEK 293 pIRES <i>aralar</i> 1 transfectadas con el vector shRNA.pCRII-TOPO A6	72
Figura 19. <i>Knock-down</i> de aralar en las células INS-1	73
Figura 20. Rescate de la expresión de aralar en la línea aralar KD	74
Figura 21. Generación de aralar mutado en los motivos EF que unen Ca^{2+} y de la línea Mut 37	76
Figura 22. Efecto del <i>knock-down</i> de aralar en la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS) en mitocondrias aisladas de células INS-1	78
Figura 23. Efectos del <i>knock-down</i> de aralar en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	79
Figura 24. Sensibilidad a aminooxiacetato (AOA) de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria inducida por glucosa en células INS-1 <i>empty</i> pSUPER y aralar KD	81
Figura 25. Efectos del <i>knock-down</i> de aralar en la secreción de insulina inducida por glucosa	82
Figura 26. Activación por Ca^{2+} de la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS) en mitocondrias aisladas	85
Figura 27. Autofluorescencia de NAD(P)H medido mediante microscopía multifotón en células INS-1 Wt 24	86
Figura 28. Respuesta de NAD(P)H inducida por glucosa en ausencia de Ca^{2+} extracelular en las líneas celulares aralar KD, Wt 24 y Mut 37	88
Figura 29. Efecto de las señales de Ca^{2+} en la respuesta de NAD(P)H inducida por glucosa en las líneas celulares aralar KD, Wt 24 y Mut 37	91
Figura 30. Representación de la respuesta máxima y el área bajo la curva del aumento de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa en presencia de señales grandes y pequeñas de Ca^{2+} en células INS-1 aralar KD, Wt 24 y Mut 37	93
Figura 31. Oxidación de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ piruvato en células Wt 24 y aralar KD	94
Figura 32. Secreción de insulina estimulada por UTP	95
Figura 33. Ingesta de comida diaria	98
Figura 34. Desarrollo del experimento de dieta grasa (HF) en ratones <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	98

Figura 35. Pesos en ratones <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	99
Figura 36. Test de tolerancia a glucosa (al inicio del experimento) y niveles de glucosa e insulina en ratones hembras <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	101
Figura 37. Medida de los niveles de glucosa e insulina en el test de tolerancia a glucosa (GTT) en hembras <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	103
Figura 38. Test de tolerancia a glucosa (al inicio del experimento) y niveles de glucosa e insulina en ratones machos <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	104
Figura 39. Medida de los niveles de glucosa e insulina en el test de tolerancia a glucosa (GTT) en machos <i>Aralar</i> ^{+/+} y <i>Aralar</i> ^{+/-}	107
Figura 40. Curvas de envejecimiento	108
Figuras Discusión	
Figura 41. Fuente alternativa de glutamato en la mitocondria de las células-β INS-1	116
Figura 42. Diagramas de las vías de reciclaje del piruvato en la célula-β	118
Figura 43. Evolución del peso y de los niveles de insulina en plasma con la edad en ratones C57BL/6xSv129	123
Figura 44. Esquema de la aportación relativa de las lanzaderas redox del músculo esquelético al fenotipo <i>thrifty</i>	125

Índice de tablas

Tablas Introducción

Tabla 1. Características de las líneas celulares secretoras de insulina	42
---	----

Tablas Materiales y métodos

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de aralar contenida en cada uno de los oligonucleótidos	53
Tabla 3. Oligonucleótidos para el genotipado de los ratones deficientes en aralar	64
Tabla 4. Composición de las dietas HF o control usadas en el experimento	65

Tablas Resultados

Tabla 5. Comparación de los valores de hiperpolarización de $\Delta\psi_m$ en respuesta a 15 mM glucosa en células Wt 24 y aralar KD	80
Tabla 6. Secreción de insulina y contenido total en las líneas aralar KD, Wt 24 y Mut 37	83
Tabla 7. Aumento de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa en ausencia de Ca^{2+} extracelular	87
Tabla 8. Aumento de NAD(P)H mitocondrial (Mit) inducido por glucosa en presencia de 1,5 mM Ca^{2+} o 250 μ M ATP y 100 μ M EGTA	92
Tabla 9. Parámetros iniciales en ratones hembras de 6 meses de edad	97
Tabla 10. Parámetros iniciales en ratones machos de 6 meses de edad	97
Tabla 11. Regresión lineal de las curvas de envejecimiento	109

Abreviaturas

$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradiente electroquímico de protones
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Calcio citosólico
$[\text{Ca}^{2+}]_m$	Calcio mitocondrial
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana de mitocondrial
ADP /ATP	Adenosina 5' di/trifosfato
AGC	Transportador de aspartato-glutamato
ANT	Translocasa de nucleótidos de adenina
AOA	Aminooxiacetato
Asp	Aspartato
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca^{2+}	Calcio libre
CaMCs	Transportadores mitocondriales con dominios de unión a calcio.
CaU	Uniportador mitocondrial de Calcio
CIC	Transportador de citrato/isocitrato
CL	ATP citrato liasa
DAHP	Dihidroxiacetona fosfato
DIC	Transportador de dicarboxilatos
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
RE	Retículo endoplásmico
F	Fluorescencia
F_0	Fluorescencia inicial
F_{340}	Fluorescencia a 340 nm
F_{380}	Fluorescencia a 380 nm
FA	Ácido graso
FACS	del inglés, <i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADH_2 / FAD	Flavin-adenina dinucleótido reducido/oxidado
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonilcianuro de p-trifluorometoxifenilhidrazona
fs	femtosegundo
G3P	Glicerol-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

GC	Transportador de glutamato/hidroxilo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
Glc	Glucosa
GPS	Lanzadera de glicerol-fosfato
GSIS	Secreción de insulina inducida por glucosa
GTT	Test de tolerancia a glucosa
HF	Dieta rica en grasas
ICDH	Isocitrato dehidrogenasa
IFU	del inglés, <i>Infectious units</i>
ITT	Test de tolerancia a insulina
K_{ATP}^{+}	Canales de potasio dependientes de ATP
KD	del inglés, <i>Knock-down</i>
KO	del inglés, <i>Knock-out</i>
KRBH	Tampón Krebs-Ringer bicarbonato hepes
KRP	Tampón Krebs-Ringer fosfato
Mal	Malato
MAS	Lanzadera de malato-aspartato
AST	Aspartato amino transferasa
MCs	Transportadores mitocondriales
ME _m /c	Enzima málico mitocondrial/citosólico
mGPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial
mitDH	Deshidrogenasa mitocondrial
ml	mililitro
mm	milímetro
MODY	del inglés, <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MSK	Medio manitol-sacarosa-potasio
Mut	Mutado
NAA	N-Acetil-aspartato
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida-adenina dinucleótido oxidado/reducido
NADP-IDH	Isocitrato deshidrogenasa citosólica dependiente de NADP
nm	nanometro
Nt	Nucléotido
OAA	Oxalacetato
OGC	Transportador de α -cetoglutarato/malato
ORF	Marco de lectura abierto

PC	Piruvato carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
Pir	Piruvato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rAd	Adenovirus recombinante
Rh123	Rodamina 123
RNA Pol III	RNA polimerasa III
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNAm	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Rojo de Rutenio
s	Segundo
SNC	Sistema Nervioso Central
SCaMCs	Transportadores mitocondriales dependientes de calcio cortos
SEM	Error estándar de la media
shRNA	del inglés, <i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	del inglés, <i>Small interfering RNA</i>
T2D	Diabetes tipo 2
TBS	Tampón tris salino
TCA	Ácidos tricarboxílicos
UCP	del inglés, <i>Uncoupling protein</i>
UPR	del inglés, <i>Unfolded protein response</i>
UTP	Uridina 5' trifosfato
VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
Wt	del inglés, <i>Wild-type</i>
α -KG	α -cetoglutarato
α -KGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
μ g	Microgramo
μ m	Micrometro

Summary

Summary

Aralar (AGC1) is one of the isoforms of the mitochondrial aspartate-glutamate carrier, and the key component of the malate-aspartate shuttle (MAS), which is involved in the transfer of redox equivalents produced in glycolysis from cytosol to mitochondria. Aralar has Ca^{2+} -binding motifs (EF-hands) in its N-terminal portion facing the mitochondrial intermembrane space. Previous studies from our laboratory have shown that MAS activity is activated by cytosolic Ca^{2+} with a $S_{0.5}$ of ~ 300 nM in brain, heart and skeletal muscle; below the K_m of the Ca^{2+} uniporter, and thus, MAS activation by Ca^{2+} constitutes a mechanism for transducing Ca^{2+} signals to mitochondria independent of the Ca^{2+} uniporter.

The importance of aralar in metabolic glucose signalling in β -cells has been addressed by silencing of aralar in INS-1 β -cells which resulted in a complete abolition of MAS activity. Under these conditions, glucose-induced insulin secretion (GSIS) and mitochondrial NAD(P)H formation were inhibited by 20-25%.

The importance of Ca^{2+} -binding by aralar was addressed by introducing mutations in aralar which blocked Ca^{2+} -binding. As these mutations abolish Ca^{2+} activation of MAS, while preserving its basal activity, MAS activation by Ca^{2+} in mitochondria from INS-1 β -cells is clearly conferred by its functional EF-hand pair composed of EF1-EF2. MAS was found to have a Ca^{2+} requirement to be operative in intact INS-1 β -cells, as glucose-stimulated NAD(P)H formation in mitochondria seems to correspond to pyruvate oxidation in the total absence of extracellular Ca^{2+} , without any participation of aralar. When small cytosolic Ca^{2+} signals are applied, mitochondrial NAD(P)H formation induced by glucose is potentiated in intact INS-1 β -cells, and this potentiation does not take place when aralar has mutations in its EF1-EF2 Ca^{2+} -binding motifs.

The hypothesis that a single aralar allele may be a risk factor for the development of type 2 diabetes in mice after a year long high fat diet was tested. The results showed that even after this long lipotoxic treatment, insulin secretion was maintained. However, old *Aralar*^{+/-} mice had a tendency towards a decreased insulin resistance compared to wild-type mice, possibly involving the muscle.

Introducción

Introducción

1. La mitocondria

1.1. Transportadores mitocondriales

1.1.1. Características generales

En la mitocondria tienen lugar numerosos procesos relacionados con el aporte de energía a las células, como el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la β -oxidación de ácidos grasos; que producen FADH_2 y NADH , sustratos de la cadena respiratoria. La mitocondria también se requiere para la síntesis y degradación de aminoácidos, la síntesis de grupos hierro-azufre y hemo, y la generación de calor mediante la disipación del gradiente electroquímico de protones, $\Delta\mu\text{H}^+$. Además, la mitocondria replica el DNA mitocondrial, y transcribe y traduce el RNAm mitocondrial (Kunji, 2004).

Para llevar a cabo muchos de estos procesos fisiológicos, los metabolitos han de ser continuamente intercambiados entre la mitocondria y el citosol. Dada la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, los miembros de la familia de transportadores mitocondriales (MCs, familia SLC25) son el nexo de unión entre el metabolismo citosólico y mitocondrial, facilitando el transporte de metabolitos. Los MCs (figura 1) son proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna con una masa molecular de aproximadamente 35 kDa (Palmieri, 2004; Satrustegui *et al.*, 2007). Hasta la fecha, se han caracterizado las propiedades de algunos de los transportadores de humanos y levaduras (Palmieri, 2004; Palmieri *et al.*, 2000).

Todos los MCs son proteínas que existen sólo en eucariotas, codificadas en el núcleo (Palmieri, 2004). No se han encontrado homólogos de los transportadores mitocondriales en procariotas o archaea. Salvo en pocas excepciones en las que se ha detectado su presencia en otros orgánulos intracelulares (peroxisomas), todos los miembros de la familia se localizan en la mitocondria (Palmieri, 2004). La mitocondria de eucariotas contiene típicamente entre 35 y 55 transportadores diferentes. El genoma humano probablemente codifica 48 transportadores mitocondriales diferentes (Kunji, 2004).

Los sustratos de los transportadores incluyen nucleótidos, aminoácidos, co-factores, ácidos carboxílicos y aniones inorgánicos (Kunji y Robinson, 2006). Los MCs pueden dividirse en transportadores electrogénicos y electroneutros y utilizan el gradiente de concentración de los solutos y/o el potencial electroquímico de H^+ generado a través de la membrana mitocondrial interna por la cadena respiratoria (Palmieri, 2004).

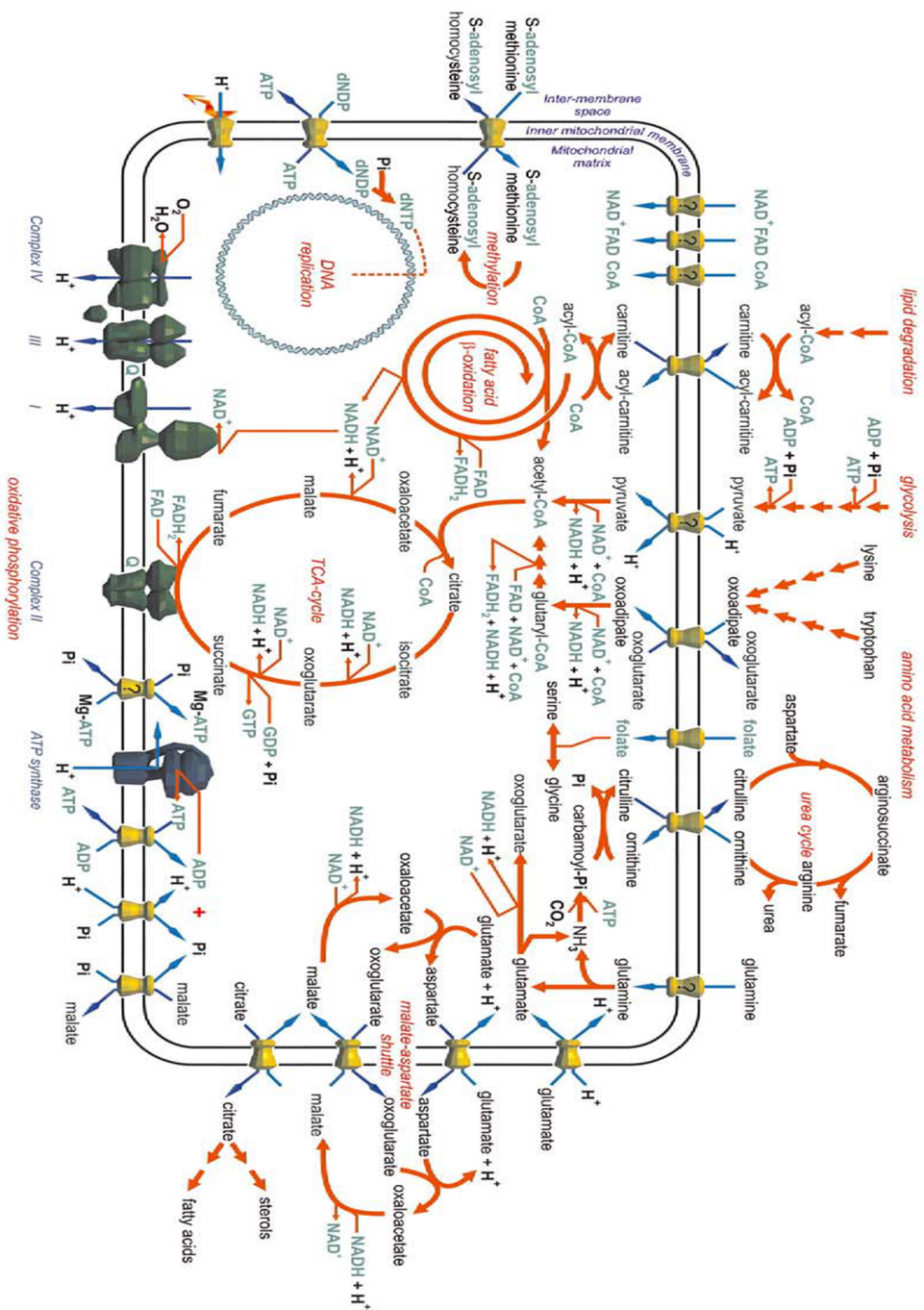


Figura 1. La familia de los transportadores mitocondriales. Representación esquemática de la membrana mitocondrial interna con la ATPasa, los complejos respiratorios y miembros de la familia de los transportadores mitocondriales, así como su relación con el metabolismo celular. Las flechas rojas indican vías metabólicas simplificadas, en verde se muestran los cofactores e intermedios de alta energía. La direccionalidad del transporte a través de la membrana se indica con flechas azules. Los transportadores de CoA, glutamina, FAD, NAD⁺ y piruvato se marcan con interrogación, ya que aún no se ha confirmado su pertenencia a esta familia (Figura tomada de Kunji, 2004).

1.1.2. Características estructurales de la familia SLC25

Una característica que define a los transportadores es la llamada estructura tripartita (figura 2A), que consiste en tres motivos de secuencia homólogos, cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, que se observó por primera vez en la secuencia publicada del transportador de ADP/ATP (Saraste y Walker, 1982). Cada motivo contiene dos segmentos hidrofóbicos, que atraviesan la membrana, conectados mediante bucles hidrofílicos (Kunji, 2004) según se muestra en la figura 2 (adaptada de Kunji, 2004 y de Nury et al., 2006).

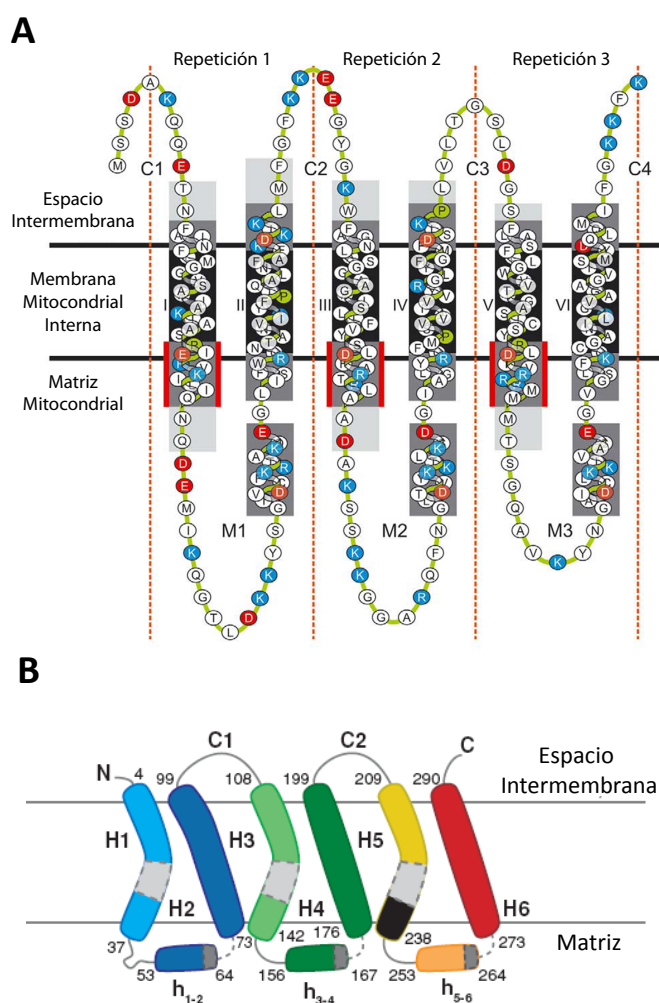


Figura 2. Estructura general de los transportadores mitocondriales. A. Se muestra la topología del transportador de levaduras ADP/ATP (AAC3), como ejemplo característico de la familia. Se muestran las tres repeticiones (separadas por la línea de puntos) del motivo compuesto por dos α -hélices (en negro, de I a VI), unidas por el bucle interno (M1 a M3) donde se resalta en gris la extensión de α -hélice predicha en base a la estructura secundaria. En las hélices I, III y V se puede ver el motivo conservado entre barras rojas. Las repeticiones se unen por los bucles C2, C3 y C4 en el espacio intermembrana. Los aminoácidos con cargas positivas se muestran en azul, con carga negativa en rojo, y las prolinas se muestran en verde (Figura tomada de Kunji, 2004). B. Se muestra la inclinación de los segmento transmembrana (TM) respecto del plano de la membrana y el acodamiento de los TM impares proporcionado por la secuencia consenso de los MC en color gris (Figura tomada de Nury *et al.*, 2006).

Cada motivo contiene una secuencia consenso conservada (tanto en la familia como en las repeticiones) P-h-D/E-X-h-K/R-X-R/K- (20-30 residuos)-D/E-G- (4 residuos) -a-K/R-G, donde *h* representa un residuo hidrofóbico y *a* uno aromático. En varios MCs, la secuencia está parcialmente modificada en una, dos e incluso las 3 repeticiones. Cada monómero MC tiene 6 hélices atravesando la membrana conectados mediante bucles hidrofílicos con los extremos N- y C- terminales situados en el espacio intermembrana (Palmieri, 2004).

Tras obtener la estructura de los primeros transportadores mitocondriales cristalizados, los de ADP/ATP de levaduras y de mamíferos, (en su forma unida al inhibidor carboxiatractilósido), se propone que la estructura común de todos ellos es parecida a un cesto abierto hacia el espacio intermembrana en el cual todos los segmentos transmembrana (TM) forman sus paredes. Los TM están inclinados respecto del plano de la membrana (figura 2B), y además los TM impares tienen un acodamiento cerca de la cara de la matriz que provoca que el cesto se cierre hacia la misma. Este acodamiento es proporcionado por la secuencia consenso de los MC (que aparece en gris en la figura 2B), en concreto por sus prolinas. Como puede verse en la figura 2, la secuencia consenso se extiende desde el acodamiento de los TM impares hasta el final de las hélices antipáticas h1-2, h3-4 y h5-6, que forman parte de los bucles entre los TM 1-2, 3-4 y 5-6 y están orientados hacia la matriz. Los sitios de unión de sustratos están localizados en la cavidad interna, hidrofílica de los MCs. Esta estructura corresponde a un monómero, aunque la mayor parte de datos bioquímicos y biofísicos indicaban que los MC eran dímeros (Nury *et al.*, 2006). Esta cuestión no ha sido resuelta para muchos MC, especialmente los nuevos.

1.1.3. Transportadores mitocondriales que unen Ca^{2+} . Familia CaMC

Dentro de la familia de transportadores mitocondriales se engloba una subfamilia que une Ca^{2+} (CaMC). La familia CaMC (figura 3) comprende dos tipos de transportadores: los transportadores de aspartato-glutamato, AGCs (Del Arco *et al.*, 2000; del Arco y Satrustegui, 1998) y los transportadores de ATP-Mg/Pi o SCaMCs (Cavero *et al.*, 2005; Traba *et al.*, 2008; Traba *et al.*, 2009a; Traba *et al.*, 2009b).

Los AGCs están representados por dos isoformas en mamíferos, aralar (del Arco y Satrustegui, 1998), y citrina (Del Arco *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1999; Sinasac *et al.*, 2004). Estas isoformas se expresan principalmente en cerebro, músculo esquelético y corazón (alarar, AGC1) e hígado (citrina, AGC2). La estructura de los AGCs, aralar y citrina, (77.8 % idéntica a aralar a nivel de secuencia de aminoácidos) difieren de la de los SCaMCs, en que las extensiones N-terminales de los AGCs son más largas (del Arco y Satrustegui, 1998) que las de los SCaMCs, y la distribución y la secuencia de los motivos “EF-hand” (EF) no están relacionados con los que tienen los SCaMCs, los cuales son muy similares a calmodulina (Satrustegui *et al.*, 2007).

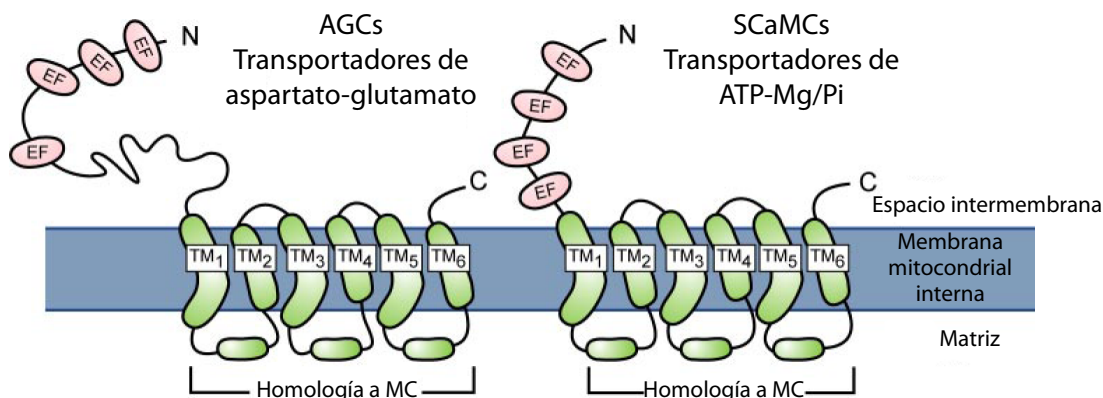


Figura 3. Esquema de la estructura secundaria de los CaMCs. En los CaMCs, la región C-terminal (~ 300 aminoácidos) corresponde a la región de homología al resto de los miembros de la familia de MC (ver figura 2 para más detalle), y la extensión N-terminal contiene motivos de unión a Ca^{2+} “manos EF” (EF). Los AGCs poseen un extremo N-terminal de mayor extensión, en el que la distribución y secuencia de los motivos EF no se relaciona con la de los SCaMCs, que poseen mayor homología con la calmodulina. TM1-6 corresponde a las 6 hélices transmembrana inclinadas características de todos los MC, tres de las cuales tienen acodamientos (1, 3 y 5) debido a la presencia de prolina conservada. Tres hélices más cortas en los bucles entre TM 1-2, TM 3-4 y TM5-6 están dispuestas hacia la matriz y en disposición paralela con la superficie de la membrana. La región MC forma un cesto que se abre al espacio intermembrana con una cavidad en forma de embudo que termina en un estrecho orificio cerca de la cara de la matriz (Figura adaptada de Satrustegui et al., 2007).

1.1.4. Aralar

Aralar (también conocido como aralar1; del Arco y Satrustegui, 1998) está codificado por el gen *Slc25a12* localizado en el cromosoma 2q31 (Sanz *et al.*, 2000), y es una de las isoformas del transportador de aspartato-glutamato (AGC) (Palmieri *et al.*, 2001).

El AGC media el intercambio electrogénico 1:1 de aspartato por glutamato con un H^+ . Forma parte de la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS), en la que es el único paso limitante.

Sus niveles de expresión son altos en los tejidos excitables cerebro y músculo esquelético, donde es la única isoforma del AGC que se expresa; y en corazón, donde se co-expresa con citrina/ AGC2. Aralar también es la única isoforma que se expresa en las células- β pancreáticas, tanto primarias como en la línea INS-1 (Rubi *et al.*, 2004).

Aralar tiene una región C-terminal dentro de la membrana mitocondrial interna y una región N-terminal larga que contiene motivos EF dispuestos hacia el espacio intermembrana (del Arco y Satrustegui, 1998; del Arco et al, 2000). La estructura canónica del motivo EF consiste en un bucle que une Ca^{2+} formado por 12 residuos con una geometría de unión a Ca^{2+} octaédrica, en la que se definen unas posiciones $x, y, z, -x, -y, -z$. La unidad funcional se compone de un par de motivos EF (Grabarek, 2006).

La región N-terminal de aralar (Contreras *et al.*, 2007) contiene 4 pares de motivos EF, y un noveno motivo EF vestigial (EF9) probablemente no-funcional, según se muestra en la figura 4 (adaptada de Contreras et al., 2007). El único par canónico y funcional está

compuesto por los motivos EF1 y EF2, lo que se confirma por estudios previos de unión a Ca^{2+} con formas delecionadas en la región N-terminal de citrina (AGC2; Del Arco *et al.*, 2000). Es posible que en aralar, el resto de motivos EF modulen la afinidad por Ca^{2+} del par EF1-EF2 (Contreras *et al.*, 2007).

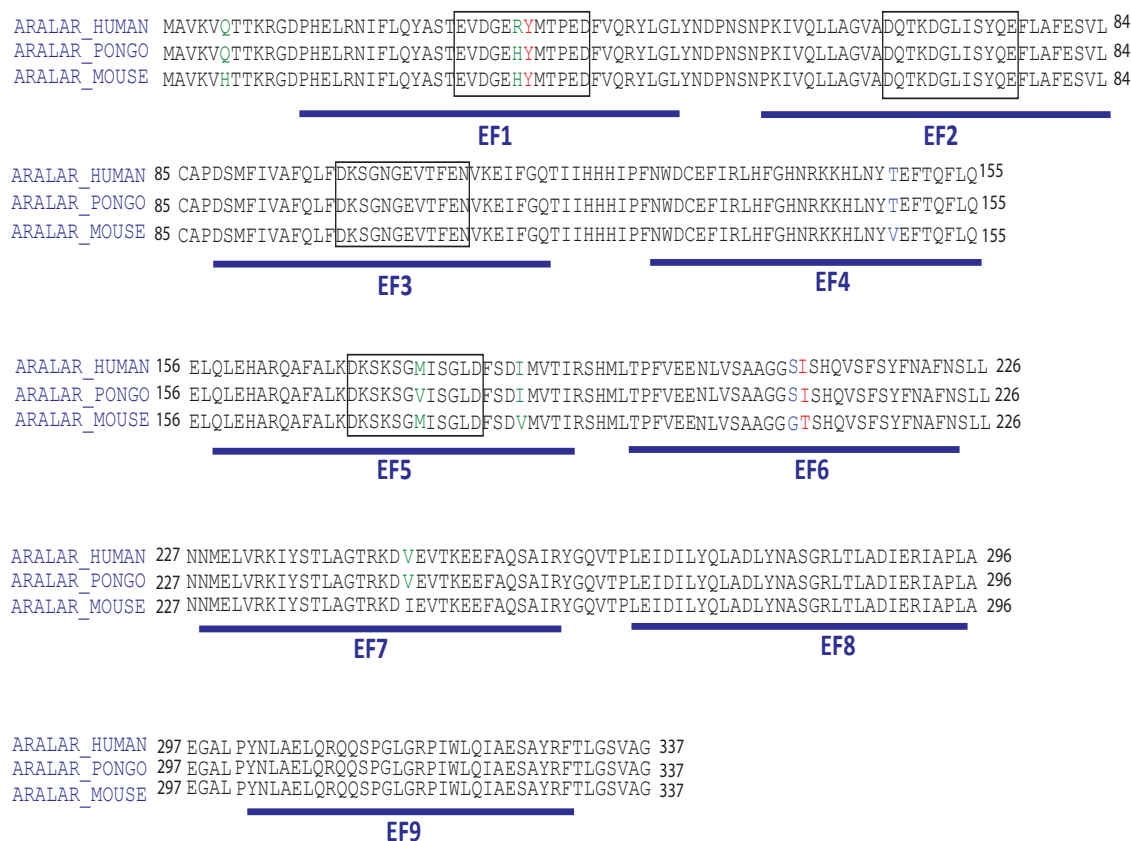


Figura 4. Motivos EF en aralar. En el alineamiento múltiple de las regiones N-terminales de secuencias representativas (de humano, orangután y ratón) de aralar están indicados los ocho motivos EF y un noveno motivo EF hipotético. Las cajas indican la posición de los bucles estructurales que se predice que serán funcionales en términos de unión a Ca^{2+} (Figura adaptada de Contreras *et al.*, 2007).

1.1.4.1. Ratones deficientes en *Aralar*

Los ratones deficientes en aralar (*Aralar*^{-/-}), generados por el método de *gene-trap*, no tienen mRNA ni proteína aralar, así como no actividad MAS detectable en mitocondrias de cerebro y músculo, dos tejidos que tienen sólo aralar como la isoforma del AGC; una disminución drástica en la respiración con los sustratos glutamato/malato en músculo esquelético; así como una gran reducción en el eflujo de aspartato de la mitocondria (Jalil *et al.*, 2005). Aunque los ratones *Aralar*^{-/-} son viables durante la embriogénesis (debido al solapamiento de aralar y citrina en tejidos fetales; Begum *et al.*, 2002; del Arco *et al.*, 2002), tienen defectos en el desarrollo, deficiencias neuromusculares y una corta vida (20 días;

(Jalil *et al.*, 2005).

Los ratones *Aralar*^{-/-} presentan una desmielinización en el SNC, asociada a una deficiencia en la síntesis de los lípidos de la mielina y a una disminución drástica en los niveles de aspartato y N-acetilaspártato (NAA), debido a la menor capacidad de síntesis de NAA de las neuronas del ratón *Aralar*^{-/-}. Se han mostrado evidencias del importante papel que el NAA (derivado del aspartato neuronal) juega en la síntesis de los lípidos de la mielina gracias a su transporte transaxonal a los oligodendrocitos, a los que aporta grupos *acetilo* como precursores lipogénicos (Baslow, 2003; Burri *et al.*, 1991; Chakraborty *et al.*, 2001; D'Adamo y Yatsu, 1966; Mehta y Namboodiri, 1995).

1.1.4.2. Estados patológicos en humanos relacionados con defectos en aralar-MAS

A. Importe de AGCs a la mitocondria. Síndrome de Mohr-Tranebjaerg

El síndrome de Mohr-Tranebjaerg (MTS/DFN-1) o de sordera/distonía es un desorden neurodegenerativo caracterizado por sordera progresiva, que evoluciona hacia ceguera, distonía, disfagia y paranoia (Jin *et al.*, 1996; Tranebjaerg *et al.*, 1995).

El síndrome se origina como consecuencia de una mutación en la proteína 1/translocasa *deafness/dystonia* de la membrana mitocondrial interna 8a (DDP1/TIMM8a), implicada en el importe de proteínas a la mitocondria. Como muchas de las proteínas mitocondriales, las proteínas precursoras del AGC se sintetizan en el citosol y necesitan ser importadas a la membrana mitocondrial interna. La información necesaria para la localización en la mitocondria de los CaMCs está en su mitad C-terminal, ya que todas las formas truncadas en el N-terminal se dirigen igualmente a la membrana mitocondrial (Arco y Satrustegui, 2005; Del Arco, 2005; Del Arco *et al.*, 2000; del Arco y Satrustegui, 2004; Palmieri *et al.*, 2001). No obstante, las extensiones N-terminal parece que son importantes para seleccionar el mecanismo para la translocación a través del espacio intermembrana de los MC. El importe a través del espacio intermembrana hasta la membrana mitocondrial interna utiliza dos tipos de complejos de 70 KDa que escoltan los precursores mitocondriales. Por un lado, el formado por Tim8p y Tim13p (Davis *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 1999; Paschen *et al.*, 2000), que parece que es el que se utiliza por aralar y citrina (Roesch *et al.*, 2004), y por otro lado, el que se compone de Tim9p y Tim10p (Curran *et al.*, 2002a; Curran *et al.*, 2002b; Koehler *et al.*, 1999), que es el que se utiliza por la mayor parte de los MC.

La mutación en DDP1/TIMM8a que aparece en los linfoblastos de los pacientes MTS/DFN-1 parece que ocasiona un importe defectuoso de aralar a la mitocondria. Esto provoca un descenso en los niveles de NAD(P)H mitocondrial debido a defectos en la actividad de MAS (Roesch *et al.*, 2004).

B. Mutaciones en aralar

Recientemente se ha descrito el caso de una paciente con deficiencia en *Aralar* (Wibom *et al.*, 2009). Presenta una mutación en homocigosis 1769A→G, que causa un cambio Q590R en una glutamina muy conservada en los AGCs, que se sitúa en la cavidad interna del transportador, justo encima del sitio que une el sustrato (Robinson y Kunji, 2006); de forma que la presencia de arginina en lugar de la glutamina atraparía al sustrato dicarboxílico impidiendo su movimiento a través de la proteína (Wibom *et al.*, 2009). La reconstitución de la forma mutante de aralar en proteoliposomas reveló su incapacidad para el transporte de aspartato o glutamato (Wibom *et al.*, 2009). La paciente, muestra hipotonía severa, retraso en desarrollo psicomotor, convulsiones y una falta global de mielinización en los dos hemisferios cerebrales junto con una reducción severa en los niveles de NAA; lo que concuerda exactamente con el fenotipo del ratón deficiente en *Aralar* (Jalil *et al.*, 2005).

1.1.5. Citrina

Citrina está codificada por el gen *Slc25a13* en el cromosoma 7q21.3, y se expresa sobre todo en el hígado, riñón y corazón.

Su deficiencia en humanos da lugar a citrulinemia tipo 2 de desarrollo adulto (Kobayashi *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2000), la cual se caracteriza bioquímicamente por una deficiencia específica de hígado de argininosuccinato sintetasa, sin que existan mutaciones en su secuencia. En el hígado, citrina forma parte de la lanzadera malato-aspartato, y además, el aspartato se necesita para el ciclo de la urea. Se ha propuesto que la deficiencia en argininosuccinato sintetasa en citrulinemia tipo 2 de desarrollo adulto se debe a la falta de su sustrato, aspartato, que es uno de los dos sustratos de la argininosuccinato sintetasa, el cual se produce en la mitocondria y se transporta al citosol vía citrina (Palmieri *et al.*, 2001).

Tras la generación de ratones *Citrina*^{-/-} (Sinasc *et al.*, 2004), se comprobó que no desarrollaban citrulinemia, posiblemente porque los niveles hepáticos de la otra lanzadera redox, la de glicerol-fosfato, son mucho mayores que en el hombre, y pueden compensar por la falta de MAS. Así, el doble *knock-out* de citrina y de la glicerol-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPD) recapituló las características de la citrulinemia de tipo 2 humana (Saheki *et al.*, 2007).

1.2. Regulación por Ca²⁺ del metabolismo mitocondrial

1.2.1. Uniportador de Ca²⁺ y deshidrogenasas mitocondriales

La señalización por Ca²⁺ a la mitocondria tiene lugar mediante la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria a través del uniportador de Ca²⁺, un canal de Ca²⁺ altamente selectivo cuya identidad es aún desconocida (Gunter *et al.*, 2004; Kirichok *et al.*, 2004).

El Ca^{2+} , una vez en la matriz mitocondrial, puede activar a tres deshidrogenasas, piruvato, isocitrato y α -KG deshidrogenasas (vía CaU-mitDH, figura 5); lo que da lugar a un aumento en la razón NADH/NAD^+ (Nichols y Denton, 1995). Se ha mostrado que la vía de señalización CaU-mitDH es muy relevante para la función celular (Brandes y Bers, 1999; Duchon, 1992; Kann *et al.*, 2003; Nicholls y Budd, 2000; Shuttleworth *et al.*, 2003; Voronina *et al.*, 2002), y el principal sistema por el cual el Ca^{2+} activa a la respiración y a la fosforilación oxidativa.

1.2.2. Regulación por Ca^{2+} de la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS)

La activación por Ca^{2+} de MAS por Ca^{2+} citosólico (figura 5) representa un mecanismo de señalización por Ca^{2+} a la mitocondria independiente de la entrada de Ca^{2+} a la misma y de la activación por Ca^{2+} de las deshidrogenasas de la matriz (Satrustegui *et al.*, 2007).

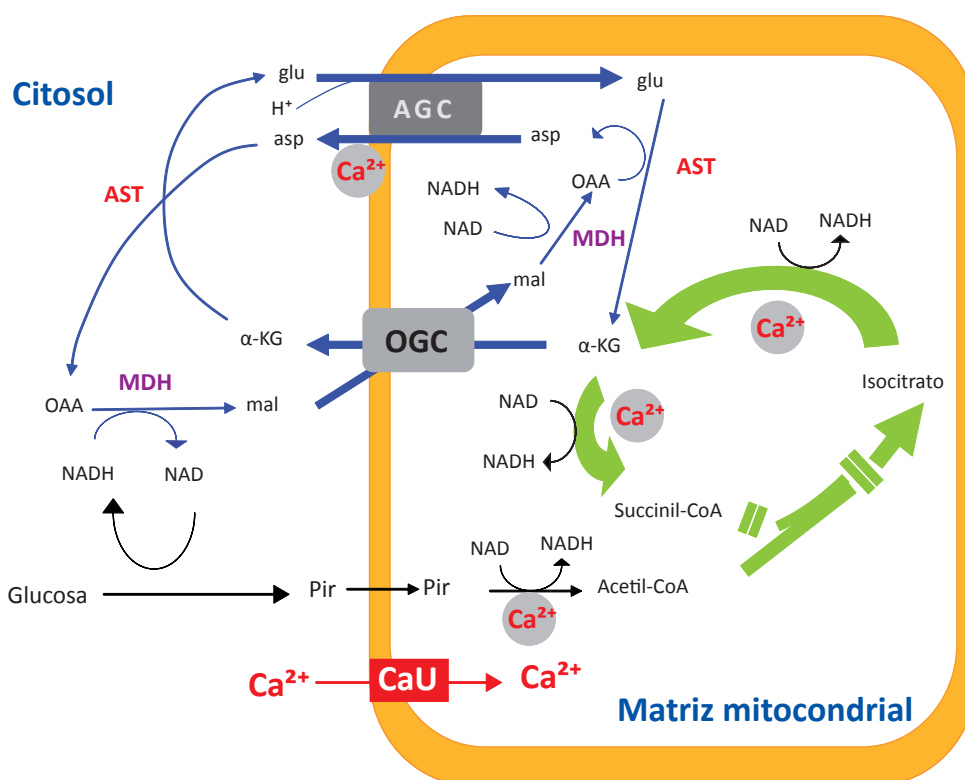


Figura 5. Regulación por Ca^{2+} de MAS y vía CaU-mitDH. La lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS), está formada por dos transportadores mitocondriales, el de aspartato-glutamato (AGC) y el de malato/ α -KG (OGC), y dos enzimas localizadas en ambos compartimentos, citosol y matriz mitocondrial: malato deshidrogenasa (MDH) y aspartato transaminasa (AST). Los metabolitos implicados en MAS son: malato (mal), glutamato (glu), oxalacetato (OAA), aspartato (asp). La lanzadera transfiere los equivalentes redox NADH generados en la glicolisis desde el citosol a la mitocondria. El NADH generado en la glicolisis es reoxidado en el citosol por la enzima MDH cediendo los electrones al OAA que se reduce a malato. El malato es transportado a la mitocondria por el transportador de α -KG/malato en intercambio con α -KG mitocondrial. Una vez en la matriz mitocondrial, la MDH mitocondrial oxida al malato regenerando OAA y NADH en la matriz. El OAA es convertido entonces en aspartato, por transaminación con glutamato (mAST) y el aspartato sale de la mitocondria por intercambio con glutamato citosólico en un proceso electrogénico llevado a cabo por el AGC. El ciclo de la lanzadera se cierra cuando el aspartato cede su grupo amino al α -KG para regenerar OAA y glutamato en el citosol.

Aumentos en $[Ca^{2+}]_i$ activan el intercambio aspartato/glutamato, en ausencia de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria (Palmieri *et al.*, 2001) y así, dan lugar a una activación de MAS, ya que el AGC es su etapa limitante.

En mitocondrias aisladas, se ha mostrado que la $S_{0.5}$ de activación por Ca^{2+} es de ~ 300 nM en cerebro, músculo esquelético y corazón (Contreras *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2006), tejidos cuya isoforma de AGC principal es aralar.

En neuronas se ha podido estudiar el papel de aralar en la formación de NAD(P)H mitocondrial dependiente de MAS, utilizando lactato como sustrato. Se demostró que en respuesta a señales de Ca^{2+} muy pequeñas, la vía aralar-MAS se activa muy preferencialmente (Pardo *et al.*, 2006). Sin embargo, las señales de Ca^{2+} grandes (producidas por la despolarización por alto K^+) activan preferencialmente la vía CaU-mitDH, no siendo detectable la vía de aralar-MAS, debido a un mecanismo de competición entre ambas vías por el sustrato común α -cetoglutarato (α -KG) (Contreras y Satrustegui, 2009). Al iniciar esta Tesis se desconocía tanto la magnitud de la vía aralar-MAS, como su relación con la vía CaU-mitDH en célula- β .

2. La célula- β

Los islotes pancreáticos (*islotes de Langerhans*) tienen un papel esencial en la homeostasis de la glucosa y contienen 4 tipos de células endocrinas, α -, β -, δ y células F. En general las células tienen esta distribución : células- α , 21%; células- β , 68 %; células- δ , 5 %; células F, 6 % (Baetens *et al.*, 1979).

El principal papel de las células- β pancreáticas es la síntesis y liberación adecuadas de insulina en respuesta a glucosa y otros nutrientes. La insulina secretada por la célula- β pancreática es un determinante clave en la homeostasis de la glucosa en sangre, regulando la captura y el metabolismo de la glucosa en los tejidos diana como músculo esquelético, hígado y grasa.

2.1. Señalización por glucosa y secreción de insulina

La célula- β es un sensor para nutrientes circulantes como glucosa, aminoácidos, así como ácidos grasos, y actúa ajustando la secreción de insulina al estado nutricional del organismo (Wollheim y Maechler, 2002).

La glucosa se metaboliza para generar señales derivadas de su metabolismo que estimulan la secreción de insulina (Henquin, 2004; Maechler *et al.*, 2006; Wollheim y Maechler, 2002). La tasa de secreción de insulina se adapta a los cambios en la concentración de glucosa que hay en sangre.

2.1.1. Reconocimiento y metabolismo de la glucosa en la célula- β

La glucosa entra en la célula- β (figura 6) mediante difusión facilitada a través del transportador de glucosa de baja afinidad y alta capacidad en la membrana plasmática (GLUT2 en roedores, GLUT1 en humanos), se equilibra rápidamente en el citosol, y se retiene dentro de la célula mediante su fosforilación por la glucoquinasa para formar glucosa-6-fosfato. La glucoquinasa es una hexoquinasa que en la célula- β determina la tasa de glicolisis, constituyendo el paso limitante de la generación de piruvato (Matschinsky, 1996; Newgard y McGarry, 1995). Este mecanismo ajusta el flujo glucolítico a la concentración de glucosa en plasma en hepatocitos e islotes pancreáticos (Matschinsky, 2002).

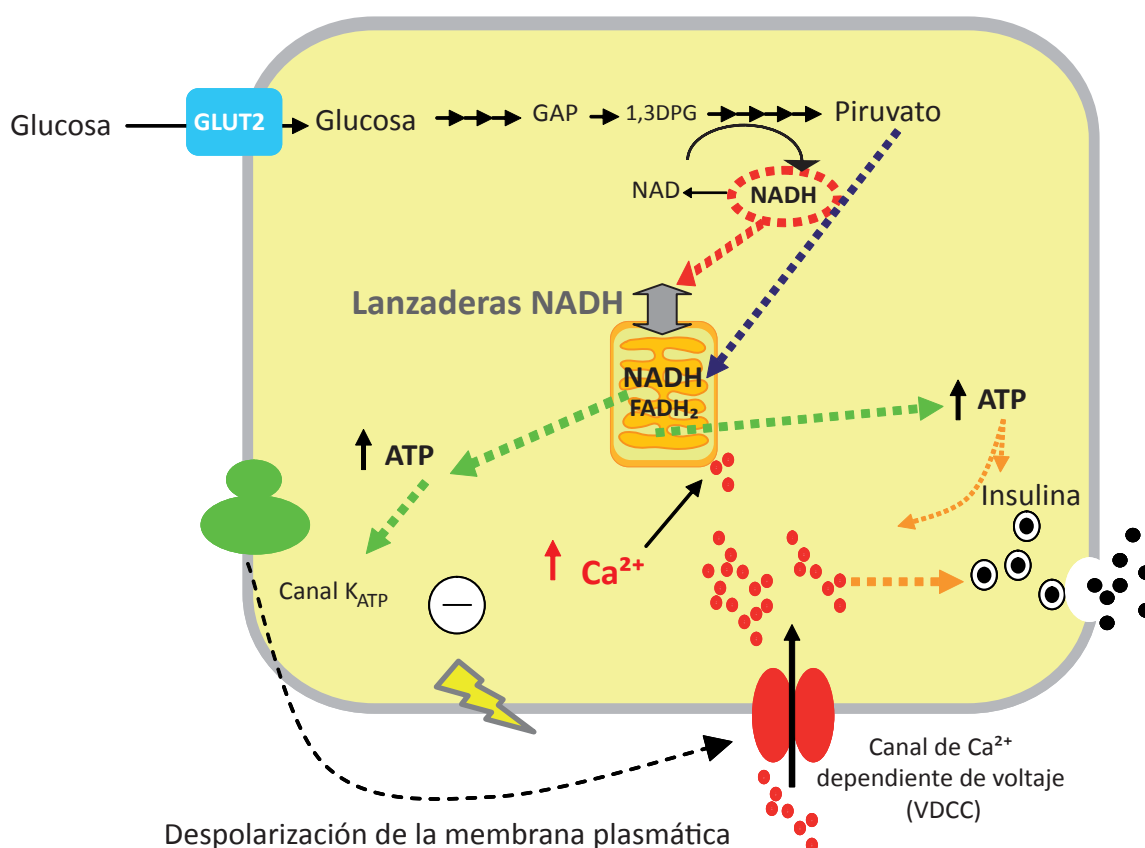


Figura 6. Modelo (canónico) de secreción de insulina en la célula- β . Papel de las lanzaderas en GSIS. La glucosa entra en la célula- β a través del transportador GLUT-2. Los equivalentes redox resultantes de la glicolisis se transfieren a la mitocondria mediante las lanzaderas de NADH, en la células- β , MAS y la lanzadera de glicerol-fosfato, que dan lugar a NADH y FADH₂ en la matriz mitocondrial, respectivamente. La oxidación del piruvato derivado de la glucosa y la transferencia de poder redox a la cadena respiratoria da lugar a la síntesis de ATP, que sale al citosol aumentando el ratio ATP/ADP, y provocando el cierre de los canales de K⁺ dependientes de ATP (K_{ATP}). La despolarización de la membrana plasmática provoca la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VDCC) y la entrada masiva de Ca²⁺ al citosol, lo que desencadena la secreción de insulina. Además, el Ca²⁺ puede entrar a la matriz mitocondrial mediante el uniportador de Ca²⁺ y activar a las deshidrogenasas mitocondriales, en la fase de amplificación de GSIS.

La glucoquinasa presenta una baja afinidad por glucosa, con una dependencia de la concentración de la misma en el rango 3-10 mM; y constituye, por lo tanto, el mecanismo esencial sensor de la célula- β en ese rango de concentraciones (Iynedjian, 1993).

El piruvato es el producto final de la glicolisis en la célula- β , la cual contiene extremadamente bajos niveles de lactato deshidrogenasa (Sekine *et al.*, 1994). Junto con la baja expresión de transportadores de monocarboxilatos en la membrana plasmática, todo ello contribuye a dirigir al piruvato a la mitocondria (Ishihara *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2001).

El piruvato entra en la mitocondria co-transportado con un H^+ (Hildyard y Halestrap, 2003; Palmieri, 2004), donde más del 90 % de los carbonos derivados de la glucosa se convierten a CO_2 . Esta alta proporción de metabolismo aeróbico es al menos tres veces mayor que en otros tipos celulares (Schuit *et al.*, 1997).

Se cree que las altas tasas de glicolisis en la célula- β se mantienen mediante la acción de las lanzaderas de NADH mitocondriales, de malato-aspartato (MAS) y de glicerol-fosfato (representada en la figura 7), que transfieren el poder redox del NADH desde el citosol a la mitocondria y son particularmente activas en este tipo de célula (Eto *et al.*, 1999; MacDonald, 1981; Noda *et al.*, 2002; Rubi *et al.*, 2004; Sekine *et al.*, 1994).

La entrada de equivalentes redox en la cadena respiratoria vía mGPD (figura 7) representa una vía rápida para la generación aeróbica de ATP. De acuerdo con esto, la expresión

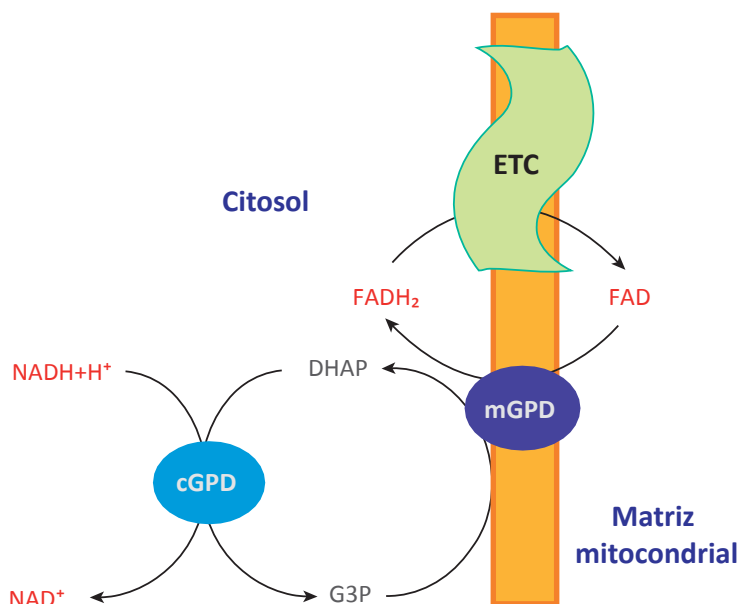


Figura 7. Lanzadera de glicerol-fosfato. La lanzadera de glicerol-3-fosfato utiliza como par redox los sustratos glicerol-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). El G3P es oxidado a dihidroxiacetona fosfato por la deshidrogenasa mitocondrial (mGPD), cuyo cofactor FAD, cede directamente los electrones al complejo II de la cadena de transporte electrónico (ETC). La deshidrogenasa citosólica (cGPD) regenera el cofactor oxidado NAD^+ al reducir de nuevo la DHAP a G3P.

de mGPD es particularmente alta en los tejidos que requieren una rápida generación de ATP, como el músculo de vuelo de insectos, las células espermáticas, y las células- β pancreáticas. Debido a que los equivalentes redox a partir del glicerol-3-fosfato (G3P) entran en la cadena de transporte electrónico a nivel del complejo III, sólo 2, en vez de 3 ATPs se generan por átomo de oxígeno o par de electrones, con la energía del tercer ATP perdido que se disipa como calor; esto es, la eficiencia de generación de ATP por esta vía es más baja que cuando los equivalentes redox entran a la cadena respiratoria en el complejo I.

Estas lanzaderas deben activarse al mismo tiempo que la glicolisis y la formación de piruvato, y se ha postulado que, junto con el piruvato, podrían ser los factores que energizan la mitocondria para la producción de ATP implicada en la secreción de insulina (figura 6).

2.1.2. Metabolismo mitocondrial del piruvato

En la matriz mitocondrial, el piruvato tiene dos destinos principales, su oxidación por la piruvato deshidrogenasa (PDH) para formar acetil-CoA (vía oxidativa; Nicholls *et al.*, 2002), o su carboxilación por la piruvato carboxilasa (PC) para formar oxalacetato (vía anaplerótica; Cline *et al.*, 2004; Schuit *et al.*, 1997).

En la vía oxidativa, el acetil-CoA entra dentro del ciclo TCA (figura 5) para llevar a cabo pasos de oxidación adicionales, para generar CO_2 y equivalentes de reducción, FADH_2 y NADH. Éstos nutren la cadena respiratoria, lo que conduce a la formación de $\Delta\mu\text{H}^+$ con la hiperpolarización de la membrana mitocondrial, y a una alcalinización de la matriz mitocondrial (Wiederkehr *et al.*, 2009). Estos cambios aceleran la síntesis de ATP a través de la ATP-sintasa (complejo V), (Duchen, 2004), el cual sale al citosol a través de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT), en intercambio con ADP.

El aumento en los niveles de ATP en el citosol (Kennedy *et al.*, 1999; Maechler *et al.*, 1998) promueve el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP (canales K^+_{ATP}) y la despolarización de la membrana plasmática (Ashcroft *et al.*, 1994). Como consecuencia, se eleva el Ca^{2+} citosólico por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) de la membrana (Ashcroft *et al.*, 1994; Rorsman, 1997). Este aumento de Ca^{2+} es el principal desencadenante de la exocitosis, el proceso por el cual los gránulos de secreción que contienen la insulina se fusionan con la membrana plasmática (Bergsten, 1995; Lang, 1999; Rorsman, 1997; Rorsman y Renstrom, 2003)

Como primera aproximación, la producción de CO_2 y la secreción de insulina simplemente seguirían la tasa de glicolisis, la cual se determina por la actividad de la glucoquinasa, que a su vez, varía con la concentración de glucosa. No obstante, a concentraciones más altas de glucosa, la glicolisis podría aumentar tanto, que dejaría de

ser el paso limitante; en esta situación la oxidación de piruvato u otros sustratos podría ser el paso limitante en la formación de ATP (Antinozzi *et al.*, 2002; Heart *et al.*, 2007). Se ha observado que concentraciones óptimas de diferentes sustratos mitocondriales estimulan la secreción de insulina hasta un nivel similar, lo que sugiere que el metabolismo mitocondrial se hace limitante y fija un umbral en la secreción de insulina en presencia de exceso de sustrato mitocondrial (Antinozzi *et al.*, 2002).

2.1.3. Papel del Ca^{2+} en la activación mitocondrial. Fase de amplificación de GSIS

Como se ha mencionado, el Ca^{2+} citosólico aumenta tras la apertura de los VDCC. El Ca^{2+} realiza múltiples funciones en las células- β además de su papel en exocitosis. En particular, tiene acciones en la mitocondria responsables de la amplificación de GSIS. Entra en la misma por el uniportador de Ca^{2+} y activa a tres deshidrogenasas mitocondriales (piruvato, isocitrato, y α -KG deshidrogenasa). Esto da lugar a la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna, que produce una mayor entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a través del uniportador de Ca^{2+} , el cual depende del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Gunter *et al.*, 2004), amplificando así la señal mitocondrial de Ca^{2+} (Ishihara *et al.*, 2003). El Ca^{2+} que se acumula en la matriz mitocondrial se transporta al exterior mediante el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, cuya actividad determina la magnitud y duración de los aumentos de la concentración de Ca^{2+} en la mitocondria (Wiederkehr y Wollheim, 2006). Estos mecanismos se traducen en una mayor producción de ATP responsable de la fase de amplificación de GSIS mediada por Ca^{2+} .

Además, el Ca^{2+} citosólico que entra por los VDCC también puede activar MAS (figura 5), independientemente de su entrada en la mitocondria, produciendo igualmente un aumento en el NADH mitocondrial. Como ambas activaciones son prácticamente simultáneas (ya que el uniportador es rápido), es interesante conocer la relación entre ellas, algo que se desconocía al iniciar el trabajo de Tesis.

Es más, la segunda lanzadera redox, la de glicerol-fosfato (figura 7) también es regulable por Ca^{2+} desde la cara externa de la membrana mitocondrial interna, *i.e.*, sin necesidad de que el Ca^{2+} entre en la mitocondria (tiene una K_m aparente para Ca^{2+} extramitocondrial de 30-130 nM en la célula- β ; Rutter *et al.*, 1992), y podría contribuir a la amplificación de la señal de Ca^{2+} en términos de mayor energización mitocondrial.

En cualquier caso, la señalización por Ca^{2+} a la mitocondria refuerza GSIS, mediante una generación de ATP sostenida durante la fase de activación mitocondrial y mediante la producción de factores metabólicos acoplantes; probablemente durante la segunda fase de la secreción de insulina o fase de amplificación (Maechler y Wollheim, 2000). Tanto la primera como la segunda fase de GSIS están atenuadas en pacientes de diabetes tipo 2 (Wollheim, 2000).

2.1.4. Anaplerosis y reciclaje del piruvato en la célula- β

Como se ha mencionado, una elevada proporción del piruvato mitocondrial (aproximadamente un 50 %, ; Jitrapakdee *et al.*, 2006) es sustrato también para la piruvato carboxilasa (PC) que tiene alta actividad en célula- β (Lu *et al.*, 2002; Schuit *et al.*, 1997). Esta reacción anaplerótica se utiliza para evitar el drenaje de derivados del ciclo de Krebs, algunos de los cuales pueden servir como factores amplificadores implicados en la secreción de insulina en respuesta a glucosa (GSIS).

La rama anaplerótica del ciclo TCA (Farfari *et al.*, 2000; Schuit *et al.*, 1997) y el reciclaje del piruvato (Farfari *et al.*, 2000; MacDonald, 1995), serán comentados con más detalle en el apartado 1.2. y en la figura 42 de Discusión.

2.1.5. Acción de la glucosa independiente de los canales K^+_{ATP}

La señal de Ca^{2+} es necesaria, pero no suficiente, para el pleno desarrollo de una correcta secreción de insulina bifásica. En 1988 se propuso, usando sulfonilureas, que la glucosa evoca una estimulación en la secreción de insulina independiente de los canales K^+_{ATP} (Panten *et al.*, 1988). Esta vía independiente de los canales K^+_{ATP} se caracterizó más tarde en 1992, cuando se demostró que la glucosa podía producir la secreción de insulina en condiciones de “clamping” o fijación de Ca^{2+} citosólico elevado (Gembal *et al.*, 1992; Henquin, 2000; Sato *et al.*, 1992). Más recientemente, modelos de ratones *knock-out* que carecen de alguna de las dos subunidades funcionales de los canales K^+_{ATP} muestran una marcada reducción (aunque no una eliminación) de GSIS (Miki *et al.*, 1998; Seghers *et al.*, 2000). Es importante resaltar, que estas células muestran una respuesta secretora parcial a la glucosa sin cambios en el Ca^{2+} citosólico, el cual ya está elevado a baja concentración de glucosa. Todos estos estudios sugieren la existencia de factores metabólicos acoplantes generados por la glucosa y necesarios para GSIS (Maechler y Wollheim, 2000).

2.2. Líneas celulares como modelos de estudio de la célula- β

La línea de células- β INS-1 (Asfari *et al.*, 1992) se utiliza como un modelo de células- β pancreáticas, ya que expresan la mayoría de sus propiedades.

La línea de células- β INS-1 retiene características respecto a diferenciación morfológica comparada con otras líneas celulares, así como una marcada respuesta insulínica a la glucosa (Asfari *et al.*, 1992). En la tabla 1 se muestra una comparación entre las características funcionales entre la línea INS-1 y otras líneas secretoras de insulina.

Tabla 1. Características de las líneas secretoras de insulina

Tipo celular	Fuente	Tiempo de división ^a	Transportador	Hexoquinasa ^b	Insulina (pg/célula) ^c	Respuesta a glucosa	Fenotipo estable	Otras hormonas del islote
<i>RIN</i>	Insulinoma transplantable	~50-80 h	Alta capacidad (GLUT-2)	HK>>GK	~0,2	No	No	Glucagón, SST
<i>INS-1</i>	Insulinoma transplantable	~100 h	GLUT-2	GK>>HK	~8	2,8-11,2 mM	Si? (>2a)	No
<i>BRIN-BD11</i>	Electrofusión RIN/células de islotes	~20 h	GLUT-2	GK> HK	~0,08	4,2-16,7 mM	Si? (>50 pases)	No?
<i>HIT-T15</i>	Células de islotes infectadas con SV40	~30 h	Baja capacidad (GLUT-1)	GK	~0,3	1-10 mM	No	Glucagón
<i>βTC</i>	Insulinoma transgénico	~60 h	GLUT-1 ^{TC1} GLUT-2 ^{TC7} GLUT-2 ^{TC6-F7}	HK>GK ^{TC1} GK>HK ^{TC7} GK>>HK ^{TC6-F7}	~0,2 ^{TC1} ~2 ^{TC7} ~3 ^{TC6-F7}	0,5-1.25mM ^{TC1} 2-17mM ^{TC7} 5-30 mM ^{TC6-F7}	No ^{TC1} No ^{TC7} Si? ^{TC6-F7}	Glucagón ^{TC1}
<i>MIN</i>	Insulinoma transgénico	~60 h	GLUT-2 ^{MIN6} GLUT1/2 ^{MIN7}	GK>>HK ^{MIN6} HK>GK ^{MIN7}	~6 ^{MIN6}	5-25 mM ^{MIN6} No ^{MIN7}	No	No
<i>βHC9</i>	Islotes hiperplásicos transgénicos	~70-100 h	GLUT-2 (y algo de GLUT-1)	GK>>HK	~5	7-15 mM	No	PP βHC9
<i>AR42J-B13</i>	Carcinoma acinar	?	GLUT-2	GK	~1,5	No	?	PP
<i>AtT-20ins</i>	Tumor pituitario gen de la insulina	?	GLUT-1	HK>>GK	~0,001	No	Si?	No
<i>Islotes</i>	Páncreas de roedor adulto	No proliferativas	GLUT-2	GK>>HK	~10-20	5-20 mM	No aplicable	Glucagón, SST, PP

^a El tiempo de división varía con el tipo de medio, la concentración de suero y el número de pases celulares.
^b Las líneas de células-β que inicialmente muestran expresión de glucoquinasa (GK) tienden a mostrar progresivamente mayor expresión de hexoquinasa (HK) con el pase celular.
^c El contenido en insulina tiende a disminuir en todas las líneas celulares con un pase en cultivo elevado.
Tabla tomada de “The Biology of the Pancreatic β-Cell” (Bittar y Howell, 1999).

2.3. Modelos de Diabetes tipo 2 por lipotoxicidad (glucolipotoxicidad) en la célula-β.

Las dos formas principales de diabetes mellitus son la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. Ambas son una causa importante de mortalidad, y hacen que disminuyan tanto la calidad como la esperanza de vida de millones de individuos afectados.

Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 se caracteriza por una severa deficiencia en la producción de insulina debido a la destrucción específica de las células-β pancreáticas por un proceso de autoinmunidad, que se desarrolla normalmente a lo largo de varios años.

La inflamación crónica que tiene lugar en el proceso está mediada por citoquinas y otros factores que se liberan y/o que se expresan en la superficie de las células inmunes que invaden los islotes, los cuales disparan vías secundarias de muerte celular en las células-β diana (Eizirik y Mandrup-Poulsen, 2001; Gillespie, 2006; Mathis *et al.*, 2001).

Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 (*type 2 diabetes*, T2D) es una enfermedad común grave causada por una secreción deficiente de insulina que está acompañada de una pérdida en la masa

de células- β en el páncreas (Kahn *et al.*, 2006; Weir y Bonner-Weir, 2004; Wiederkehr y Wollheim, 2006).

A la patogénesis de T2D contribuyen defectos tanto en la acción como en la secreción de la insulina. En el primer caso, se produce una resistencia a la insulina en los tejidos diana de la misma (grasa, músculo e hígado) (Kahn *et al.*, 2006), lo que provoca una hipersecreción de insulina por parte de las células- β pancreáticas y esto desemboca en una fase de agotamiento en la que célula- β no secreta suficiente insulina como para estimular la utilización de glucosa en los tejidos periféricos (Kahn, 2001). Según se va deteriorando la capacidad de secreción de la célula- β , la tolerancia a glucosa empeora y los niveles de glucosa en ayuno aumentan progresivamente, lo que culmina finalmente en una clara hiperglicemia (Cnop *et al.*, 2007; Festa *et al.*, 2006; Weyer *et al.*, 1999).

En el segundo caso, defectos génicos que afectan principalmente a la propia célula- β son los que contribuyen al desarrollo de T2D. Es el caso de MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), causada, entre otros, por defectos en el gen de la glucoquinasa (*GCK*) y en factores de transcripción de la célula- β como *HNF4A*, *TCF1/HNF1A*, *PDX1* o *TCF2/HNF1B* que provocan MODY de forma monogénica (Florez, 2008). Por otro lado, polimorfismos en esos y otros genes que se expresan en la célula- β , contribuyen como factores de riesgo para las formas más habituales de T2D (poligénica) y se han encontrado en recientes estudios GWAS (*genome-wide-association-scan*): componentes de los canales de K^{+}_{ATP} (*Kir6.2/KCNH11* y el receptor de sulfonilurea/*ABCC8*), el transportador vesicular de Zn de célula- β /*SLC30A8*, y otros (Florez, 2009; Frayling, 2007; Sladek *et al.*, 2007; Zeggini *et al.*, 2007).

Lipotoxicidad y glucolipotoxicidad

Una hipótesis de trabajo extendida en el campo es que la dieta desencadena T2D en individuos que tengan una propensión genética para la misma, es decir, que presenten factores de riesgo como los mencionados en el apartado anterior que afectan a la célula- β . Debido a que una dieta rica en grasas ocasiona obesidad y el síndrome metabólico, muchos de los trabajos en los que se ha utilizado una dieta de este tipo se han dedicado al estudio de la resistencia a la insulina. Sin embargo, la hipótesis que se presenta en esta Tesis es la de la acción de la lipotoxicidad directamente a nivel de la célula- β .

Los niveles fisiológicos de ácidos grasos (FA) no son tóxicos para la célula- β , es más, son esenciales para una función normal de la misma. Sin embargo, cuando son anormalmente altos, alteran la función normal de la célula- β e incluso pueden mediar procesos de apoptosis. *In vitro*, la exposición prolongada a niveles elevados de FA (sobre todo saturados) en islotes aislados o en células secretoras de insulina, aumenta la secreción de insulina basal e inhibe GSIS (Elks, 1993; Sako y Grill, 1990; Zhou y Grill, 1995; Zhou y Grill, 1994). La inhibición de GSIS es un fenómeno que también se ha visto *in vivo* en ratas (Mason *et al.*, 1999) y en

humanos (Paolisso *et al.*, 1995). Este efecto se debe a los ácidos grasos no esterificados, ya que parece haber una correlación inversa entre la acumulación de triacilgliceroles y la GSIS y apoptosis de la célula- β (Cnop *et al.*, 2001).

Los mecanismos inhibición de GSIS por los FA no están claros, y se ha propuesto que la formación de ROS, y la UCP-2 (*Uncoupling protein-2*), están implicados. Los FA activan la expresión de UCP-2 (Briaud *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2001; Lameloise *et al.*, 2001; Patane *et al.*, 2002) y debido a que GSIS depende de la generación de ATP, la posible acción desacoplante de la UCP-2 perjudicaría a la secreción de insulina (Zhao *et al.*, 2001). Sin embargo, en otro estudio, el aumento de niveles los de UCP-2 se asoció con un descenso en la producción de ROS (Produit-Zengaffinen *et al.*, 2007).

Los mecanismos de muerte de la célula- β por FA (sobre todo saturados) tampoco están claros. Además, existe controversia sobre si se requieren también altos niveles de glucosa (glucotoxicidad) para producir esos efectos (Cnop, 2008). Se propone que además de la formación de ROS, la UPR (*Unfolded Protein Response*) y el estrés de ER son mediadores de la acción apoptótica de los FA saturados (Cnop, 2008).

Objetivos

Objetivos del trabajo

La hipótesis general de trabajo es que la lanzadera de NADH malato-aspartato se activa por Ca^{2+} citosólico dando lugar a una potenciación de la formación de NAD(P)H mitocondrial, mediante un mecanismo de activación diferente al que tiene lugar cuando el Ca^{2+} entra en la mitocondria y activa a las deshidrogenasas de la matriz.

De acuerdo con esta hipótesis general hemos establecido los siguientes objetivos de trabajo:

Objetivos

1. Averiguar la función de aralar en la secreción de insulina inducida por glucosa en células- β INS-1.
2. Determinar la función de los motivos EF de aralar en la actividad basal de la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS) y en su activación por Ca^{2+} .
3. Estudio de la interacción entre la vía aralar-MAS y la vía del uniportador de Ca^{2+} y las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial en la transmisión de señales de Ca^{2+} a la mitocondria en células- β INS-1.
4. Estudio de la pérdida de una dosis génica de *Aralar* en ratones *Aralar*^{+/-} como factor de riesgo para la diabetes tipo 2 en un modelo de lipotoxicidad crónica.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos

1. Construcción de vectores

Para este estudio se han empleado shRNAs, los cuales se procesan por la endorribonucleasa Dicer cuando se introducen en la célula, según se muestra en la figura 8.

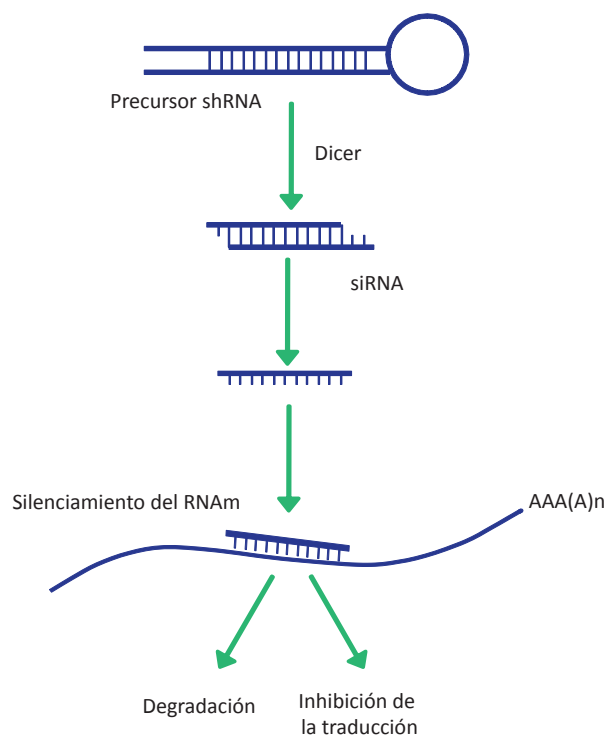


Figura 8. Silenciamiento mediante RNA de interferencia (RNAi). La degradación del precursor RNA de doble cadena, en este caso el shRNA, por Dicer da lugar a siRNAs (small interfering RNAs), que interactúan y se unen con el ARNm diana, dando lugar a su degradación o a la inhibición de la traducción (Figura adaptada de Lehninger Principles of Biochemistry, 4ª Edición).

1.1. Disminución de los niveles de aralar mediante shRNAs

1.1.1. Elección de secuencias

Con el fin de expresar los shRNAs en células de mamífero, se eligieron de manera empírica tres secuencias diana dentro de la región codificante del ARNm de aralar en las respectivas secuencias de ratón, rata y humano (NM_172436, ensamblado a partir de ESTs y NM_003705 de la base NCBI, respectivamente), siguiendo una aproximación descrita anteriormente (Elbashir et al., 2002). La distribución de las secuencias diana elegidas dentro de la secuencia de nucleótidos de aralar se muestra en la figura 9. Las pautas seguidas para esta elección fueron, en primer lugar determinar la ORF del ARNm de aralar y dentro de

ésta, elegir una ventana que comprendía desde el nt 70 a partir del codón de inicio hasta la mitad aproximadamente de la ORF. Las secuencias elegidas han de empezar en 5'-guanosina, debido a que la transcripción del RNA se empieza por una 5'-guanosina trifosfato y no terminar en T, ya que la señal de terminación es una cola de Ts. Las secuencias elegidas se analizaron por BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para asegurar que no tuviesen homología significativa de secuencia con otros genes.

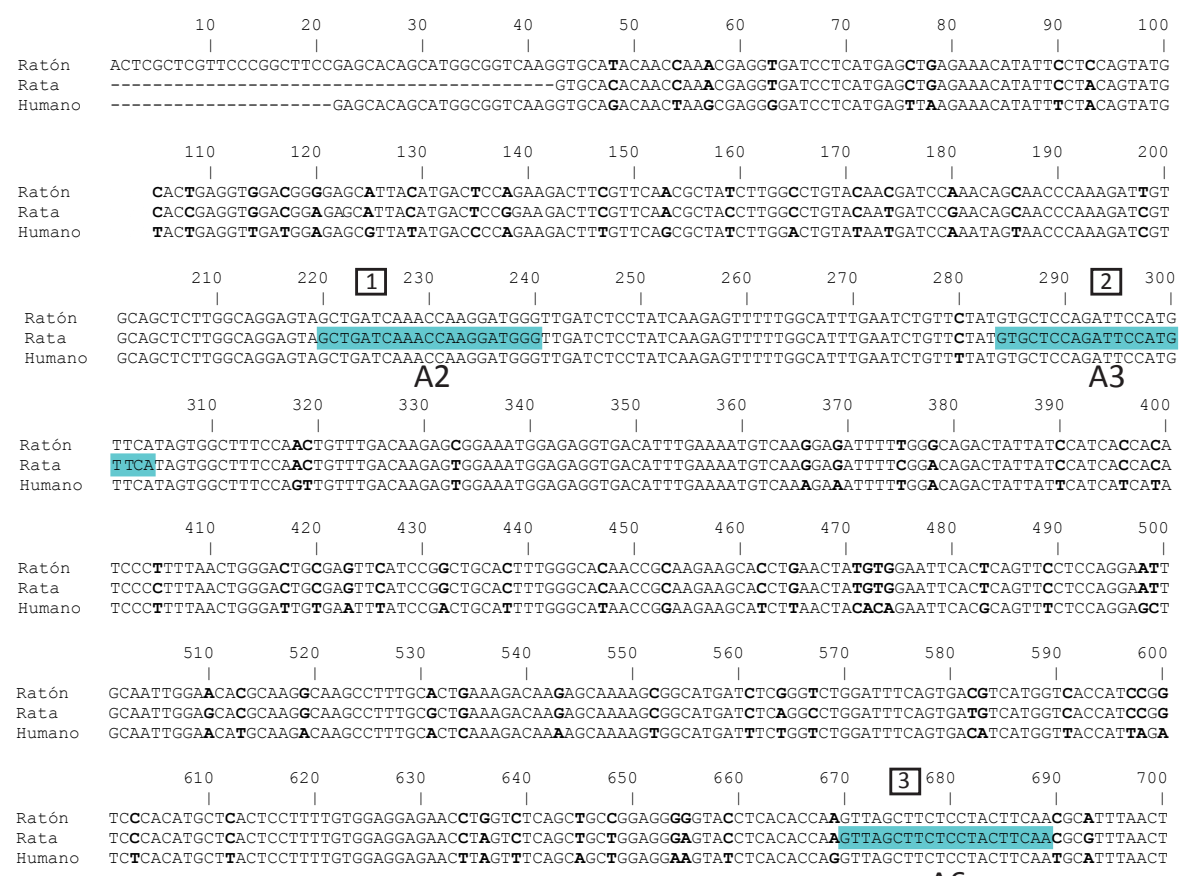


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de aralar para ratón, rata y humano. Se muestra la distribución de las secuencias diana elegidas para la construcción de los vectores shRNA, resaltadas en color azul (denominadas A2, A3 y A6; respectivamente). Los nucleótidos en negrita corresponden a posiciones no conservadas.

1.1.2. Vectores para transfecciones transitorias

Para generar los vectores *alar* shRNA.pCRII-TOPO, se diseñaron oligonucleótidos que contuviesen la secuencias dianas elegidas de *alar* (shRNA A2, A3 y A6). Estos oligonucleótidos constan de un fragmento del promotor U6 de ratón fusionado a la secuencia sentido seguida por un espaciador corto (TTCAAGAGA), a continuación la secuencia complementaria y reversa de la secuencia sentido, y por último cinco timidinas que constituyen una señal de parada transcripcional para la RNA polimerasa III.

El clonaje del promotor U6 a cada uno de los shRNAs se hizo mediante PCR y

a partir del vector PGTE U6 (Ambion), que contenía dicho promotor. Para la PCR se emplearon el oligonucleótido Sp6 y los respectivos oligonucleótidos shRNA A2, A3 y A6 que contenían una zona que hibridaba con el promotor U6 junto con cada una de las secuencias. Las secuencias contenidas en cada uno de los oligonucleótidos que se emplearon son las siguientes (tabla 2):

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de aralar contenida en cada uno de los oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Longitud (nt)	Localización
A2	5'GCT GAT CAA ACC AAG GAT GGG3'	21	1
A3	5'GTG CTC CAG ATT CCA TGT TCA3'	21	2
A6	5'GTT AGC TTC TCC TAC TTC AA3'	20	3

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización 96 °C durante 3 minutos; seguido por 30 ciclos de 96 °C por 1 minuto, 50 °C por un minuto, y 72 °C por 2 minutos; seguido por un ciclo de 72 °C por 1 minuto. Los productos resultantes de la PCR se clonaron en el vector pCRII -TOPO (Invitrogen) para generar los vectores shRNA.pCRII-TOPO A2, A3 y A6, utilizados en las transfecciones posteriores de las células HEK 293, y representados en la figura 10, junto con un ejemplo de la estructura de los cassettes shRNAs y los elementos que los componen.

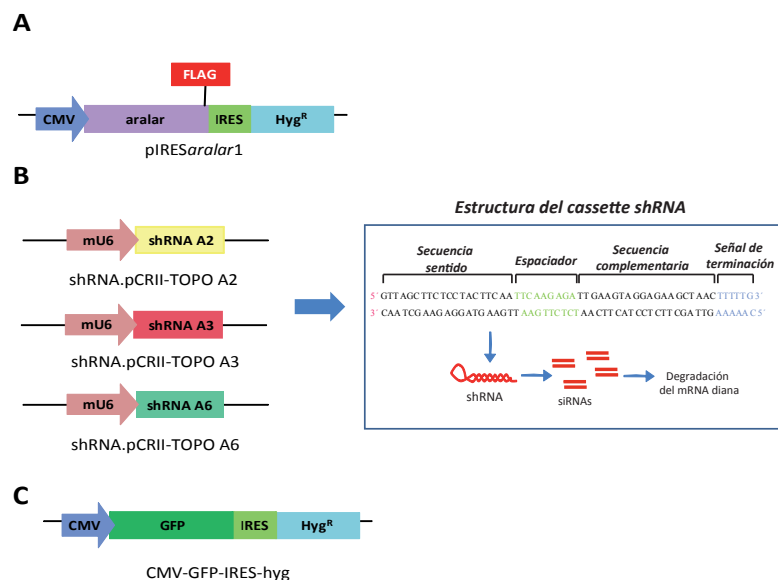


Figura 10. Vectores empleados para transfecciones en células HEK 293 y estructura de la horquilla shRNA. A. Vector pIRESaralar1. B. Vectores shRNA.pCRII-TOPO A2, A3 y A6. El cassette shRNA seguido de una cola de timidinas bajo el promotor mU6, da lugar a un transcrito específico de la RNA pol III con secuencias complementarias espaciadas por un bucle de secuencia no homóloga (verde), que se pliega en forma de horquilla y será procesada para dar lugar a siRNAs (small interfering RNAs). C. Vector CMV-GFP-IRES-hyg.

1.1.3. Vectores para transfecciones estables

Para disminuir los niveles de aralar, se han seguido métodos que se describieron previamente (Brummelkamp *et al.*, 2002), y de este modo se generaron las construcciones aralar shRNA.pSUPER o *empty* pSUPER a partir del vector pSUPER.retro. Para generar aralar shRNA.pSUPER, se digirieron, por una parte, el vector pSUPER.retro vía *EcoRI*, y por otra parte, el vector shRNA.pCII-TOPO A6 vía *EcoRI/EcoRI* para aislar el cassette shRNA A6. Posteriormente, el cassette shRNA A6 se introdujo en pSUPER.retro, y de la construcción resultante se deleccionó el promotor H1 vía *NspV/AccI*. La orientación de la construcción se verificó mediante secuenciación del DNA del vector. En la figura 11 se muestran de manera esquemática los vectores que se construyeron para las transfecciones estables de las células INS-1.

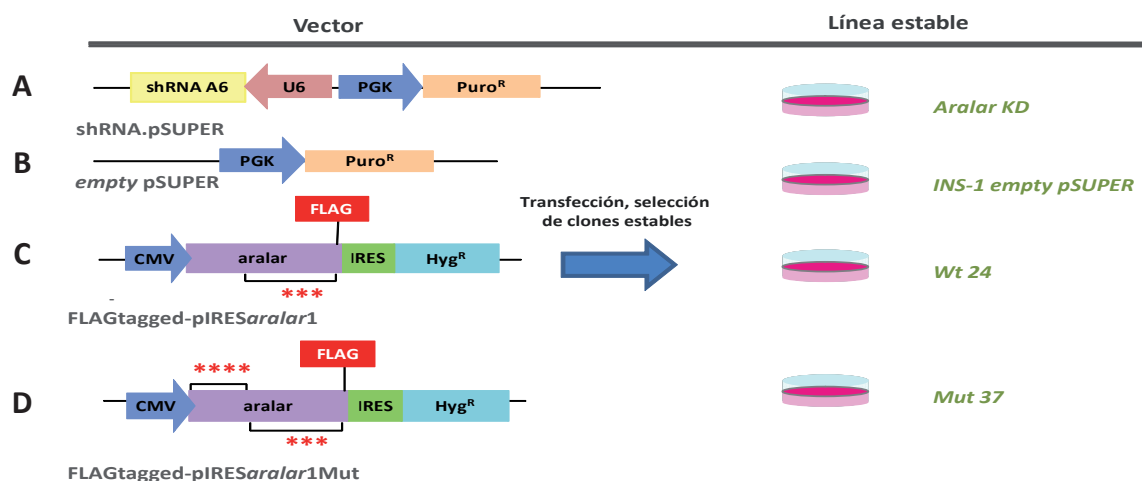


Figura 11. Vectores empleados para la generación de líneas estables a partir de células INS-1. A. Vector shRNA.pSUPER, B. Vector *empty* pSUPER, C. Vector FLAG-tagged pIRESaralar1, D. Vector FLAG-tagged pIRESaralar1Mut.

1.2. Reconstitución de aralar en células aralar KD

Para reconstituir la expresión de aralar nativo en células que expresaban el vector aralar shRNA.pSUPER, se introdujeron mutaciones en la secuencia diana reconocida por el shRNA elegido (shRNA A6). Con este fin, se introdujeron mutaciones en la tercera base de los codones para Phe²¹⁶, Ser²¹⁷ y Tyr²¹⁸ en el fragmento de 1,04 kb *BstEII* de FLAG-tagged pIRESaralar1 (figura 11) (del Arco y Satrustegui, 1998; Palmieri *et al.*, 2001), mediante mutagénesis dirigida usando el QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). La secuencia resultante escapa a los efectos del RNA de interferencia (RNAi), en tanto que se mantiene la secuencia de aminoácidos de la proteína.

1.3. Reconstitución de aralar mutado en células aralar KD

Para generar una proteína aralar inactiva en la unión a Ca^{2+} , los aminoácidos Glu²⁷ (posición *x*) y Asp²⁹ (posición *y*) del motivo EF1, y los aminoácidos Asp⁶⁵ (posición *x*) y Thr⁶⁷, (posición *y*) del motivo EF2 de la secuencia de aralar (del Arco y Satrustegui, 1998), se reemplazaron por alaninas mediante mutagénesis dirigida para dar lugar al vector FLAG-tagged pIRESaralar1Mut (figura 11). Las secuencias de los vectores FLAG-tagged pIRESaralar1 y FLAG-tagged pIRESaralar1Mut se confirmaron por secuenciación.

2. Separación de las células GFP⁺ mediante FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).

Para separar las células GFP⁺ mediante FACS, 48 horas o 72 horas después de las transfecciones se levantaron las células de la placa, se resuspendieron en tampón de *sorting* (PBS, 5 mM EDTA, 25 mM HEPES pH 7,0) y se filtraron a través de un filtro de 30 μm . Tras la separación se centrifugó el conjunto de células GFP⁺ y posteriormente se resuspendieron en PBS con una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, Iodoacetamida 2 mM, Leupeptina 20 $\mu\text{g/ml}$).

3. Cultivos celulares y transfecciones

3.1. Células HEK 293

Se empleó la línea HEK 293 transfectada de manera estable con el vector pIRESaralar1 (del Arco y Satrustegui, 1998; Palmieri *et al.*, 2001). Brevemente, se clonó la secuencia codificante de aralar1 en el vector pIREShyg (Clontech) digerido con *BamHI* para obtener el vector pIRESaralar1. La línea HEK 293 pIRESaralar1 se cultivó en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) que contenía 10% de suero fetal bovino (Gibco-BRL) y en presencia de higromicina B (Calbiochem) a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, a 37 °C y en una atmósfera de CO_2 del 7%. Para obtener las muestras de células que serían analizadas mediante western blot, se sembraron 10×10^6 células en placas P100. A las 16 horas aproximadamente se transfectaron con Lipofectamina Plus (Invitrogen) con los plásmidos shRNA y reportero con una cantidad de 4 μg o 2 μg y 1,33 μg , respectivamente, para 10×10^6 células. Tras 48 o 72 horas, se analizó el porcentaje de células GFP positivas (GFP⁺), y se separaron éstas de las que no lo eran mediante FACS.

3.2. Células INS-1

Las células INS-1 se cultivaron en una atmósfera húmeda que contenía un 5% CO_2

en un medio compuesto por RPMI 1640 suplementado con 10 mM Hepes, 10 % (v/v) suero fetal bovino (FBS), 2 mM glutamina, 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 1 mM piruvato sódico, y 50 µM 2-mercaptoetanol (Asfari *et al.*, 1992).

Los vectores aralar shRNA.pSUPER y *empty* pSUPER se transfectaron en las células INS-1 (1 µg DNA/ 10 x 10⁶ células). Se seleccionaron líneas estables que expresaban shRNA.pSUPER (alaral KD) mediante resistencia a puromicina cultivando las células durante 3 semanas en medio que contenía 1 µg/ml puromicina (Sigma). Los vectores FLAG-tagged pIRESalaral1 y pIRESalaral1Mut se transfectaron en la línea *alaral KD* (1 µg ADN/ 1 x 10⁶ células). Se seleccionaron líneas estables que expresaban FLAG-tagged pIRESalaral1 (Wt 24) o pIRESalaral1Mut (Mut 37) mediante resistencia a higromicina cultivando las células durante 3 semanas en medio que contenía 200 µg/ml higromicina (Calbiochem) y 1 µg/ml puromicina. Las líneas celulares clonales se expandieron y mantuvieron en presencia de 1 µg/ml puromicina o 1 µg/ml puromicina con 100 µg/ml higromicina. Para todas las transfecciones se usó Lipofectamine Plus (Invitrogen, Life Technologies). Las líneas celulares clonales se aislaron mediante anillos de clonaje (Sigma) y sus niveles de proteína se verificaron mediante western blot.

4. Western blots

Para determinar los niveles de proteína de aralar, FLAG-tagged aralar o su mutante para unir Ca²⁺, las células se homogenizaron en tampón de lisis (250 mM sacarosa, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT pH 7,4, 1 mM iodoacetato y 1mM PMSF). La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford. Los homogenados (20 µg) se sometieron a electroforesis en geles del 8% de poliacrilamida en presencia de SDS, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Sleicher and Schuell), y se analizaron por western blot. Las membranas se incubaron 2 horas con solución de bloqueo (5% leche desnatada, 0,05% Tween-20 en TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (2 % leche desnatada, 0,05% Tween-20 en TBS) seguido de tres lavados de 15 minutos con TBS 0.05% Tween-20. El anticuerpo secundario se incubó 30-45 minutos (en 2 % leche desnatada, 0.05% Tween-20) seguido de tres lavados de 15 minutos con TBS 0.05% Tween-20 y un lavado de 15 minutos con TBS. Todo el proceso se llevó a cabo a T^a ambiente. Como anticuerpos primarios se usaron anticuerpos específicos contra el péptido de aralar 12-332 (extremo N-terminal) (Del Arco *et al.*, 2000) y contra el péptido FLAG (Sigma) (1:5000), con los anticuerpos secundarios Gar-PO y Ham-PO (*goat anti-rabbit* y *horse anti-mouse peroxidase-conjugated* IgG). Para revelar se usó la técnica de luminiscencia ECL (Amersham Biosciences). Como control de carga se usó un anticuerpo contra la subunidad β de la F₁-ATPasa mitocondrial (1:

10.000) (cedido por el Profesor J.M. Cuezva; Cuezva *et al.*, 2002). La cuantificación de las bandas con respecto a la subunidad β de la F_1 -ATPasa mitocondrial se llevó a cabo mediante densitometría (GS-800 Calibrated densitometer Bio-Rad, con el software Bio-Rad Quantity One).

5. Aislamiento de mitocondrias a partir de células INS-1

Las células (7 placas de 145 cm² confluentes de células) se lavaron dos veces en tampón de homogenización (250 mM sacarosa, 20 mM HEPES, 2 mM EGTA, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0,1 % BSA, pH 7,4), se levantaron de la placa usando un rascador y se sedimentaron (1.700 rpm, 10 minutos). Las células se homogenizaron (homogeneizador Dounce B) en tampón de homogenización suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 mM iodoacetamida), y los núcleos, el debris celular y las células intactas se eliminaron mediante 3 minutos de centrifugación a 3.000 rpm. Los sobrenadantes mitocondriales se centrifugaron (11 minutos, 10.000 rpm) para obtener las fracciones mitocondriales que se resuspendieron en MSK (mM manitol, 25 mM sacarosa, 5 mM fosfato potásico, 20 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 100 mM KCl, y 0,1% BSA, pH 7,4) y se mantuvieron en hielo hasta su uso (figura 12). Las proteínas se midieron mediante el método de Bradford.

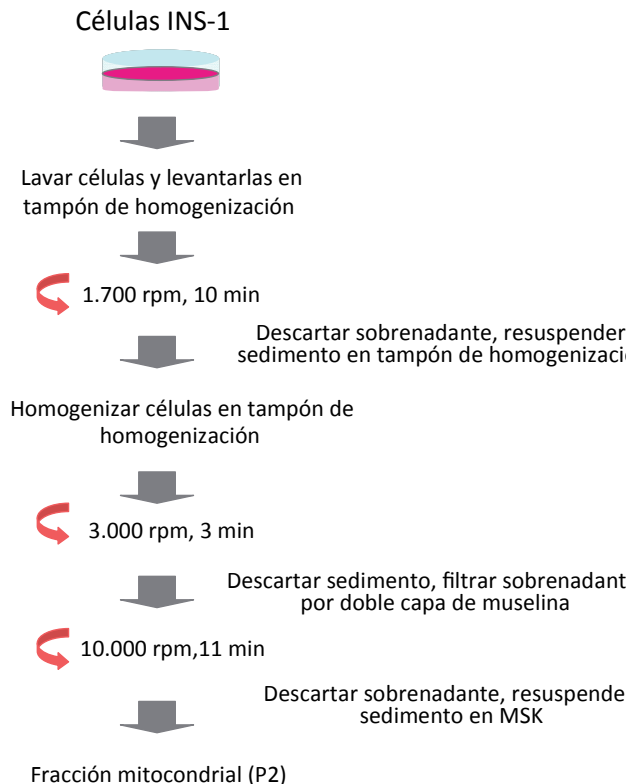


Figura 12. Esquema general del proceso de aislamiento mitocondrial. El medio de aislamiento fue medio de homogenización, realizando el proceso entero a 4°C. El sedimento final (P2) contiene la fracción mitocondrial, que se resuspende en MSK, y se mantiene en hielo para su uso.

La competencia respiratoria de las preparaciones mitocondriales se determinó verificando el consumo de oxígeno dependiente de succinato y la respiración estimulada por ADP con un electrodo tipo Clark (aproximadamente 20 y 60 nanoátomos de O_2 /min/mg proteína para las mitocondrias en el estado 4 y el estado 3, respectivamente).

6. Reconstitución de la lanzadera de NADH malato-aspartato

La lanzadera se reconstituyó en mitocondrias aisladas de células- β INS-1 según se ha descrito previamente (Contreras *et al.*, 2007; Jalil *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2006), con la excepción de que el aspartato se omitió del ensayo. Las fracciones mitocondriales (0,4 mg) se resuspendieron en 2 ml de MSK y la lanzadera se reconstituyó en presencia de 4 unidades/ml de glutamato-oxalacetato transaminasa, 6 unidades/ml de malato deshidrogenasa, 66 μ M NADH, 5 mM malato, 0,5 mM ADP, 200 nM rojo de rutenio, y adiciones apropiadas de $CaCl_2$. La actividad de la lanzadera se inició con la adición de 5 mM glutamato y se midió como la disminución de la fluorescencia de NADH (Aminco-Bowman Series 2 luminescence spectrometer, excitación a 340 nm, emisión a 465 nm) a 37 °C con agitación constante (figura 13), la cual fue calibrada con los estándares de NADH adecuados.

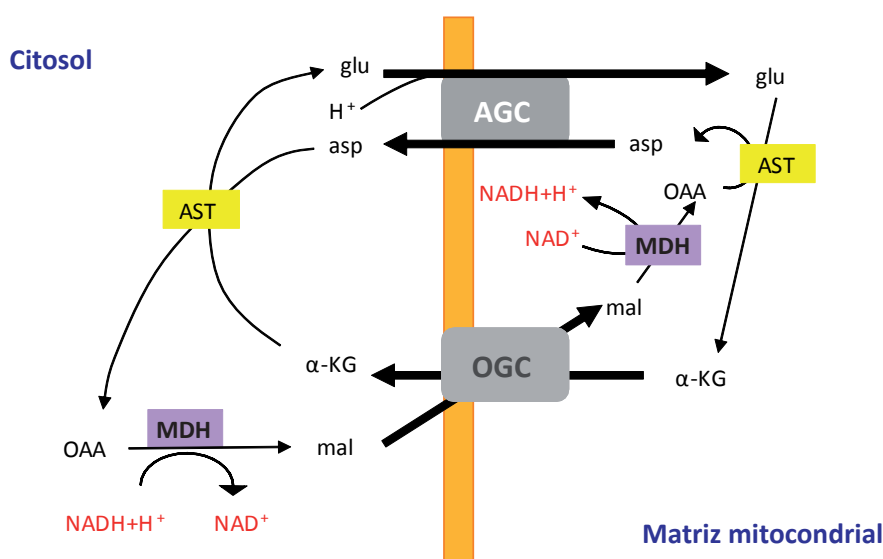


Figura 13. Reconstitución de MAS. La actividad se midió como la desaparición de fluorescencia de NADH en el medio, tras la adición de glutamato (Glu).

7. Calibración de Ca^{2+} libre

Las concentraciones de Ca^{2+} libre se determinaron en soluciones con las sondas fluorescentes Fura-2 ácido (por debajo de 1 μ M Ca^{2+} libre) y Calcium-Green (por encima de 1 μ M Ca^{2+} libre) según se ha descrito previamente (Pardo *et al.*, 2006). Las concentraciones

de Fura-2 ($K_d = 224$ nM; excitación, 340 y 380 nm; emisión, 510 nm) y Calcium-Green ($K_d = 14$ μ M; excitación, 506 nm; emisión, 532 nm) fueron 5 y 0.1 μ M, respectivamente (Molecular Probes). La concentración de Ca^{2+} libre se obtuvo mediante procedimientos establecidos para sondas ratiométricas o no ratiométricas (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Martinez *et al.*, 1988).

8. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Las células se sembraron 48 horas antes del experimento en placas de 24 pocillos cubiertas previamente con polilisina (10 μ g/ml). Las células se pre-incubaron con 10 μ g/ml rodamina 123 durante 20 minutos a 37 °C en tampón *Krebs-Ringer Bicarbonate Hepes* (tampón KRBH; 140 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 0,5 mM NaH_2PO_4 , 0,5 mM $MgSO_4$, 1,5 mM $CaCl_2$, 2 mM $NaHCO_3$ y 10 mM Hepes, pH 7,4) y se lavaron en el mismo tampón. El potencial de membrana se monitorizó a 37 °C en KRBH 1,5 mM $CaCl_2$ con un fluorímetro lector de placas (Fluostar Optima) con filtros de excitación y emisión fijados en 485 y 520 nm, respectivamente. Las adiciones de glucosa 15 mM (Glc) o FCCP 1 μ M se hicieron cuando se indica.

9. Ensayo de secreción de insulina

Las células se sembraron 48 horas antes del experimento en placas de 24 pocillos previamente cubiertas con poliornitina. Las células se mantuvieron 2 horas antes del experimento en RPMI sin glucosa (Gibco) a 37 °C.

Durante el experimento se lavaron y se pre-incubaron 30 minutos en KRBH con 1,5 mM $CaCl_2$ suplementado con 0,1% BSA. A continuación, las células se estimularon durante 30 minutos con diferentes concentraciones de glucosa, 2,5 o 15 mM o KCl 30 mM (en presencia de 2,5 mM glucosa) o durante 75 minutos con glucosa 2,5, 5,5 o 11 en presencia y ausencia de UTP 100 μ M; o 30 mM KCl (en presencia de 2,5 mM glucosa). La secreción de insulina se determinó en el sobrenadante de las células con un kit ELISA de insulina (SPI-BIO). El contenido total de insulina en las células se extrajo con 10% ácido acético en etanol (v/v). La insulina secretada se expresó como el porcentaje respecto al contenido de insulina celular total.

10. Medidas mediante técnicas de imaging de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en células INS-1

Para las medidas de Ca^{2+} intracelular se utilizó la sonda Fura-2 AM, que resulta de la unión del Fura-2 a un grupo éster (AM), la cual puede entrar en la célula a través de la membrana, ya que es una molécula sin carga. Una vez dentro de la célula, se procesa por esterasas celulares y da lugar a una forma cargada que se queda retenida dentro de la misma.

Las células se sembraron 48 horas antes del experimento en cubres de vidrio tratados previamente con polilisina (50 $\mu\text{g/ml}$) en una placa de 4 pocillos (Nunc). Para el experimento las células se cargaron con 2 μM de Fura-2 AM (Molecular Probes) durante 40 minutos a 37 °C en medio RPMI 1640 sin glucosa, y se lavaron durante 5-10 minutos con KRBH con 1,5 mM CaCl_2 . Los cubres se montaron en una cámara de perfusión en la plataforma del microscopio como se ha descrito previamente (Ruiz *et al.*, 1998), y la fluorescencia de la sonda Fura-2 fue se midió de manera ratiométrica usando una excitación alterna de 340 y 380 nm y un filtro de emisión de 510 nm con un objetivo Neofluar 40X/0,75 (Pardo *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 1998). Las adiciones, se hicieron inyectando de una vez los productos donde se indica. El análisis en células individuales de los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se expresó como la razón entre la fluorescencia a 340 nm y la fluorescencia a 380 nm (F_{340}/F_{380}). La adquisición de imágenes se llevó a cabo con el software Aquacosmos 2.5 (Hamamatsu).

11. Medidas de Ca^{2+} mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) en células INS-1

Para determinar las concentraciones de Ca^{2+} mitocondrial en células INS-1, en primer lugar se infectaron las células con adenovirus que codificaban aequorina dirigida a la mitocondria. En presencia de Ca^{2+} , la aequorina unida a la celenteracina da lugar a la emisión de luz que se monitorizó durante el ensayo.

11.1. Adenovirus recombinantes que codifican mt-Aequorina

Los adenovirus recombinantes (rAd) que codifican aequorina dirigida a la mitocondria (mt-Aequorina) utilizados se han descrito previamente (rAdCAGl_xSTl_xmAQ; Ishihara *et al.*, 2003), así como los procedimientos para su construcción y para la medida de las cantidades de virus (Miyake *et al.*, 1996). Los rAd se purificaron por centrifugación con un gradiente de CsCl.

11.2. Infección de células INS-1 con rAd mt-Aequorina

Las células INS-1 se sembraron en cubres de plástico Thermanox (13 mm diámetro,

Nalge Nunc; USA) tratados previamente con poliornitina. Las células adheridas se infectaron con rAd que portaban aequorina dirigida a la mitocondria (Ishihara *et al.*, 2003) con 66 IFU (*Infectious Units*) por célula, de un stock que estaba a 2×10^7 IFU (*infectious units*)/ μl . Los rAd se diluyeron en RPMI y se añadieron 50 μl de la dilución a cada uno de los pocillos con células de la p24. Tras 90 minutos a 37 ° se retiró de las células el medio con rAd y se repuso medio de cultivo hasta que se realizó el experimento.

Las células se analizaron 48 horas después de la infección viral. Las células se incubaron con celenteracina (2,5 μM) en RPMI 1640 sin glucosa (Gibco) durante 2 horas. En la figura 14 está representada la reacción que tiene lugar en las células cuando se incuban con celenteracina para dar lugar a la emisión de luz en presencia de Ca^{2+} (Rizzuto *et al.*, 1995). Las células se perfundieron con KRBH (1 ml/min) a 37 °C y se monitorizó la señal de luminiscencia dependiente de Ca^{2+} emitida por la fotoproteína aequorina.

Las medidas de aequorina se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Kennedy *et al.*, 1996).

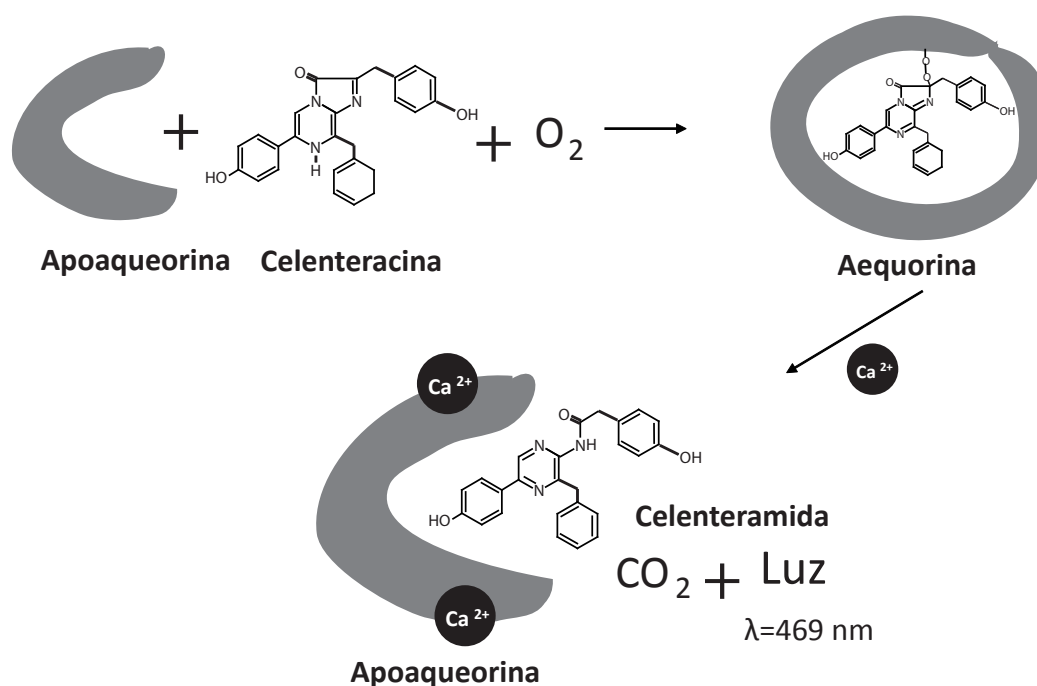


Figura 14. Reacción de emisión de luz en células que expresan mt-Aequorina. Las células se incuban con celenteracina, que es el cofactor de aequorina. Durante la incubación la celenteracina atraviesa la membrana de las células gracias a su naturaleza lipofílica y se conjuga con apoaequorina para formar aequorina, que es la forma activa de la proteína. La presencia de Ca^{2+} da lugar a la activación de la actividad catalítica de aequorina, la cual oxida a la celenteracina y da lugar a apoaequorina, celenteramida, CO_2 y luz visible ($\lambda=469 \text{ nm}$). La intensidad de emisión de luz es proporcional al incremento de Ca^{2+} intracelular en el rango fisiológico (Rizzuto *et al.*, 1995).

12. “Imaging” (o imagen) de NAD(P)H mitocondrial por microscopía de dos- fotones

Las células INS-1 se sembraron en cubres de vidrio de 24 x 50 mm dispuestos en placas de cultivo de 100 mm de diámetro, que se montaron en una cámara de perfusión; o en cubres de vidrio sellados a pocillos de plástico (4-well LabTek chamber slide Systems, NUNC). En ambos casos los cubres se trataron previamente con polilisina. Las células se lavaron una vez y se pre-incubaron en tampón KRBH durante 1 hora antes del experimento.

La microscopía de excitación de dos-fotones se llevó a cabo usando un microscopio invertido Nikon TE300 con un objetivo de aceite S Fluor 40X/1,30 y una magnificación adicional digital de 2X, acoplado a un sistema de microscopía confocal/multifotón RTS 2000 MP (Bio-Rad). Un láser multifotón infrarrojo (Coherent Mira 690–1000 nm) proporcionó excitación a la fluorescencia intrínseca del NADH con una onda larga a 735 nm con pulsos de 150 fs. Las imágenes se recogieron con un filtro de emisión de 480/50 nm. Las células se mantuvieron a 37 °C con una plataforma de temperatura controlada en el microscopio. Las adiciones, donde se indica, se hicieron inyectando de una vez los productos. Las imágenes (512 x 512 pixels por frame, 0,178 μm /pixel), se tomaron cada 10 s durante 400–1300 s. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa MetaMorph (Universal Imaging). Las intensidades mitocondriales se determinaron en células individuales siguiendo procedimientos previamente descritos para células- β de islotes pancreáticos (Patterson *et al.*, 2000; Rocheleau *et al.*, 2002) o para neuronas (Pardo *et al.*, 2006). Las células individuales se contornearon, y se establecieron umbrales de intensidad, de manera que se resaltasen las áreas brillantes que correspondían a mitocondrias en foco. Con estos umbrales, los cuales podrían infravalorar la fluorescencia mitocondrial pero evitan la contaminación con el compartimento citosólico, se calculó la intensidad de estas áreas brillantes. Los cambios en la fluorescencia (F) del NAD(P)H mitocondrial se cuantificaron y normalizaron como valores de fluorescencia respecto a la fluorescencia inicial (F/F_0).

13. Oxidación de glucosa y piruvato

Se sembraron 4×10^5 células /pocillo en una p24 previamente tratada con polilisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y a las 24 horas se realizó el experimento. Las células se pre-incubaron 2 horas en tampón KRBH con 1,5 mM CaCl_2 y posteriormente se lavaron con tampón *Krebs-Ringer Phosphate* (tampón KRP; 136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25 mM MgSO_4 , 1,25 mM CaCl_2 , 5 mM fosfato sódico, pH 7,4). El experimento para atrapar $^{14}\text{CO}_2$ se llevó a cabo según se ha descrito previamente (Palmieri *et al.*, 2001). Cada experimento se hizo en KRP 1,25 mM CaCl_2 en un volumen final de 200 μl . Como control negativo (blanco), se usó un pocillo sin

células. Las células se incubaron 2 horas a 37 ° C con los sustratos. La reacción se paró con 40 µl de citrato 0,4 M y tras 30 minutos a 37 ° C, la radiactividad que quedó atrapada en los filtros se contó en un contador de centelleo. Para los experimentos con 15 mM glucosa, se añadieron 7 µCi/ml de [U-¹⁴C]glucosa (Amersham) a la mezcla total (resultando en 1,4 µCi/pocillo) y para los experimentos con piruvato se añadieron 1,25 µCi/ml de [1-¹⁴C]piruvato (Amersham) a la mezcla total (resultando en 0,25 µCi/pocillo). Para retener el ¹⁴CO₂ emitido por las células durante el experimento se usaron filtros de 22 mm de diámetro (Millipore), previamente humedecidos con 3,5 M NaOH.

14. Animales

Los animales se mantuvieron en cuartos climatizados a 23-25 °C con libre acceso a agua y comida y un ciclo de luz de 12 h/día.

14.1. Mantenimiento de la colonia de Aralar

Los ratones deficientes en *Aralar* se generaron por la estrategia de *gene-trapping* (Zambrowicz *et al.*, 1998) por la empresa Lexicon Genetics, según se ha descrito (Jalil *et al.*, 2005). El gen de *Aralar* está interrumpido por el cassette 5'-Ara+Neo en el intrón 13 (figura 15) y los ratones tienen un fondo genético híbrido C57BL/6xSv129.

Para evitar un exceso de consanguinidad, la colonia de animales se mantuvo en hemizigosis mediante cruzamiento con hembras *wild-type* del fondo C57BL/6xSv129 (Harlan Iberica). Los animales *Aralar*^{+/-} y *Aralar*^{+/+} procedentes de estos cruces se aparean para obtener los ratones *Aralar*^{+/-}, *Aralar*^{+/+} utilizados en el presente estudio. Estos ratones presentan la correspondiente disminución de niveles de proteína en western blot (Jalil *et al.*, 2005).

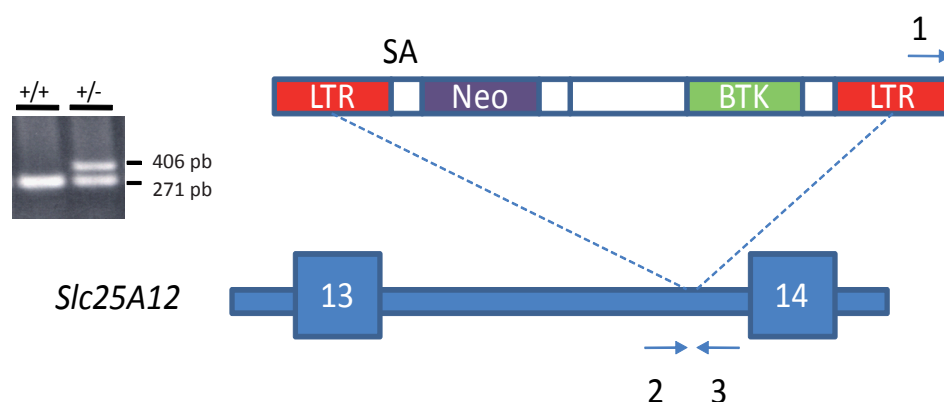


Figura 15. Generación y genotipado de animales deficientes en *Aralar*. A. Esquema mostrando el lugar de inserción (intrón 13) del cassette de interrupción en el gen *Slc25A12*. Se muestran los oligonucleótidos 1 y 2 en el vector/intrón 13, y el oligonucleótido común 3 en el intrón 13 que se utilizan para amplificar los fragmentos salvaje (271 pb) y mutado (406 pb), que se resuelven en un gel de agarosa al 1.5 % (panel izquierdo).

14.2. Genotipado de ratones deficientes en *aralar*

El DNA genómico se extrajo a partir de colas de ratones con un kit comercial (Nucleospin Tissue Kits, Clontech), según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el genotipo de los ratones se identificó por el método de la doble PCR con los siguientes oligonucleótidos: oligonucleótido sentido mAra3'LTR F3 (5'-GTTCTCTAGAACTGCTGAGG-3') que amplifica sólo alelos mutados, oligonucleótido sentido mAra int 13F1 (5'-GATGTGAGAACTCACCAGTGT-3'), que amplifica sólo alelos salvajes, y oligonucleótido antisentido mAra int 13B (5'-ACCACCACCAGCGTGTCTCAGC-3') que amplifica alelos tanto mutados como *wild-type* (tabla 3).

La mezcla de PCR se amplificó mediante el siguiente programa: tras una incubación de 94 °C 5 minutos; 94°C 1 minuto, 58°C 1 minuto, 72°C 1 minuto; durante 35 ciclos. Los fragmentos resultantes se separaron en un gel de agarosa del 1,5 %.

Tabla 3. Oligonucleótidos para el genotipado de los ratones deficientes en *Aralar*

Nombre	Secuencia	Alelo	Localización
nAra3'LTR F3	5'-GTTCTCTAGAACTGCTGAGG-3'	Mutado	1
nAra int-13F1	5'-GATGTGAGAACTCACCAGTGT-3'	Salvaje	2
mAra int-13B	5'-ACCACCACCAGCGTGTCTCAGC-3'	Ambos	3

14.3. Medida de la ingesta en ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}

Los ratones se alimentaron *ad libitum* con pienso estándar. Se midió el consumo de comida durante 14 días a la misma hora pesando la comida que quedaba cada día en la cubeta

14.4. Estudio de la administración de dieta grasa en ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}

14.4.1. Composición de la dieta administrada a los ratones y medida de la ganancia de peso

Los ratones, de aproximadamente 6 meses de edad, se distribuyeron en grupos de 8-10 ratones y se alimentaron con una dieta rica en grasas (HF), que contenía un 60 % kCal procedentes de grasa o una dieta baja en grasas (dieta control), que contenía un 10 % kCal procedentes de grasa (Research Diets, D12492 y D12450B, respectivamente) que se han usado previamente (Winzell *et al.*, 2003). La composición de las dietas se muestra en la tabla 4.

Las dietas, tanto HF como control, se administraron durante 50 semanas, y cada ratón se pesó semanalmente.

Tabla 4. Composición de las dietas HF o control utilizadas en el experimento

Dieta	Proteínas		Carbohidratos		Grasas		Total kCal/g
	kCal (%)	g	kCal (%)	g	kCal (%)	g	
HF (D12492)	20	26,2	20	26,3	60	34,9	5,24
Control (D12450B)	20	19,2	70	67,3	10	4,3	3,85

14.4.2. Test de tolerancia a glucosa (GTT) en ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}

Los tests de tolerancia a glucosa se llevaron a cabo antes del inicio del estudio de dieta HF (ratones de 6 meses de edad), y tanto en las semanas 25-27 (ratones de 12 meses de edad) como en las semanas 48-50 (ratones de 18 meses de edad). Tras un ayuno de toda la noche, los ratones recibieron 150 mg (al comienzo del experimento de dieta HF) o 2 mg/g (en las semanas 25-27 y en las semanas 48-50) de D-glucosa en suero salino mediante una sonda gástrica. La glucosa en plasma se determinó en una gota de sangre de la mejilla del ratón a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos con un glucómetro comercial (Accutrend GC/GCT, Roche). Se recogieron muestras de sangre a los tiempos 0, 15 y 60 minutos para analizar posteriormente los niveles de insulina.

Para el estudio se analizaron 5-10 ratones de cada sexo y genotipo.

14.4.3. Medida de la insulina en plasma

Las muestras de sangre de los ratones se centrifugaron 15 minutos a 10.000 rpm para recoger la fracción que correspondía al plasma sanguíneo. Las alícuotas de plasma se mantuvieron a -70 °C hasta su posterior análisis. La determinación de insulina en plasma se realizó con el método de Elisa (Rat/Mouse Insulin Elisa Kit 96-Well Plate Linco, Millipore). Las áreas bajo las curvas de los valores de insulina en plasma en los minutos 0, 15 y 60 del GTT se hallaron como la diferencia entre el área total y el área del rectángulo cuya altura está determinada por el valor en el minuto 0.

15. Análisis Estadístico

Todos los valores se presentan como media \pm SEM, y el análisis estadístico se ha realizado con el programa Sigma Stat 3.1 para Windows.

Resultados

Resultados

Estudio de la implicación de aralar en el metabolismo-secreción de insulina en la célula- β

1. Generación de líneas estables derivadas de la línea INS-1

1.1. Diseño de shRNAs para disminuir los niveles de aralar

La disminución de los niveles de aralar se llevó a cabo mediante la técnica de RNA de interferencia (RNAi). Para ello, se construyeron un total de 3 plásmidos, cada uno con su respectivo *cassette* shRNA (*short hairpin* RNA). El *cassette* shRNA está compuesto por una secuencia de nucleótidos elegida en el RNAm de aralar (la elección de las secuencias A2, A3 y A6 se detalla en el apartado 1.1. de materiales y métodos) unida mediante un espaciador de 9 nt a su secuencia complementaria, seguida de una cola de cinco timidinas en el extremo 3' que funcionan como señal de terminación para la RNA Pol III (Bogenhagen *et al.*, 1980). A cada *cassette* shRNA se le fusionó mediante PCR el promotor U6, el cual dirige la síntesis de un transcrito específico de la RNA Pol III (Kunkel *et al.*, 1986). Cada uno de los *cassettes* shRNA-U6 resultante se introdujo mediante clonaje en el vector de expresión pCII-TOPO para dar lugar a los vectores shRNA.pCII-TOPO A2, A3 o A6. Una vez dentro de la célula se predice que el RNA que se ha transcrito se pliega para formar una horquilla de RNA de doble cadena con un saliente 3' de varias timidinas (Sui *et al.*, 2002). Este transcrito precursor es degradado dentro de la célula por la ribonucleasa Dicer, para dar lugar a siRNAs funcionales (*small interfering RNAs*) que interaccionan y se unen al RNAm diana silenciándolo (ver apartado 1 de materiales y métodos) (Brummelkamp *et al.*, 2002). Para evaluar la eficiencia para disminuir los niveles de aralar de los *cassettes* A2, A3 y A6, el vector shRNA.pCII-TOPO que contenía cada uno de dichos *cassettes* se transfectó de manera transitoria en la línea HEK 293 pIRES α alar1 (Palmieri *et al.*, 2001). Esta línea celular sobre-expresa aralar de manera estable y se generó mediante la transfección de células HEK 293 con el vector pIRES α alar1 (del Arco A. *et al.*, 2000; Palmieri L. *et al.*, 2001). El nivel de proteína aralar resultante es de aproximadamente 4 veces respecto a la línea HEK 293 nativa (Palmieri *et al.*, 2001). En la figura 16 se describe el procedimiento experimental que se siguió para discriminar la eficiencia de cada uno de los *cassettes* shRNA para disminuir los niveles de aralar.

Cada uno de los vectores shRNA.pCII-TOPO generado se co-transfectó con el plásmido reportero CMV-GFP-IRES-hyg (Navarro-Galve *et al.*, 2005) (Figura 16A), que

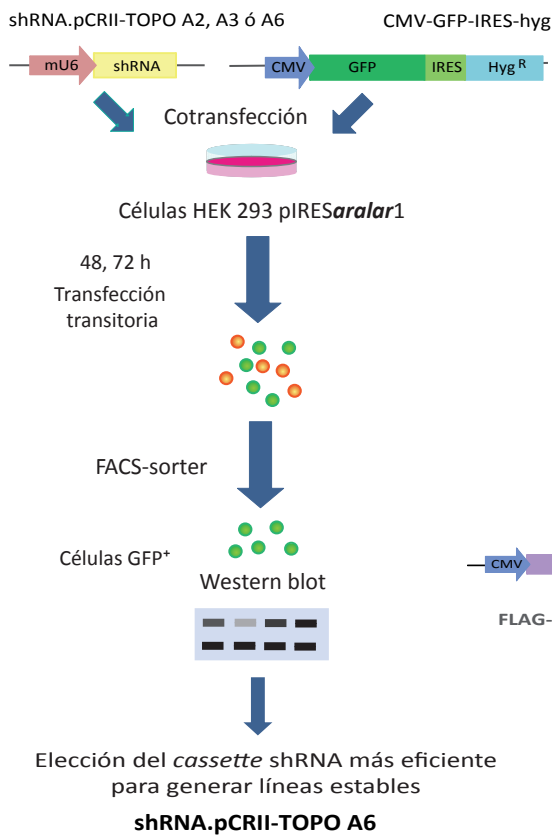
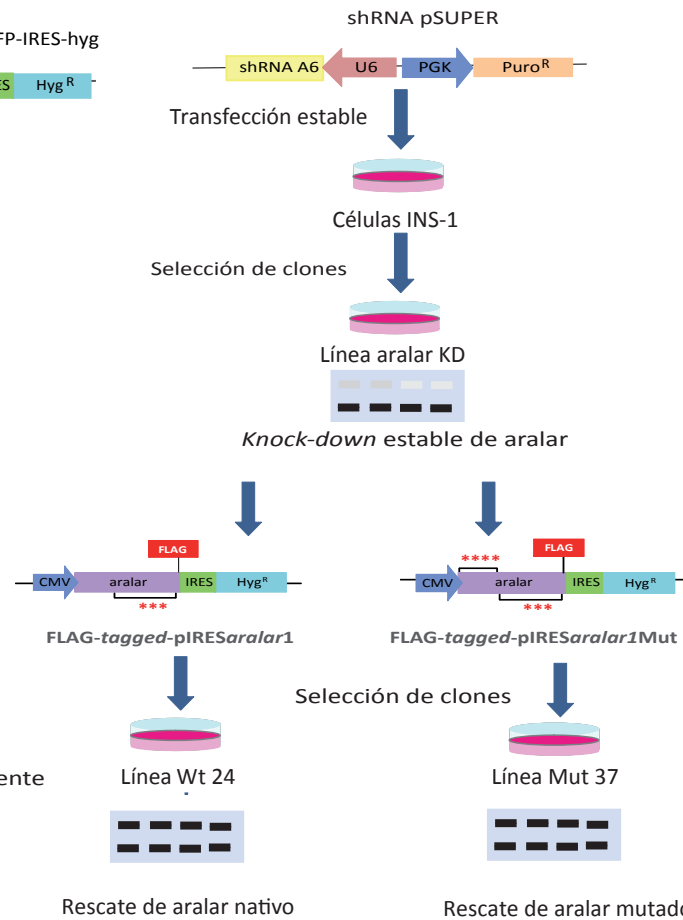
A**B**

Figura 16. Procedimiento experimental seguido con el RNAi y en el rescate de la expresión de aralar nativo y mutado. A. Los vectores shRNA.pCRII-TOPO A2, 3 ó 6 y el vector CMV-GFP-IRES-hyg se co-transfectaron en la línea HEK 293 pIRESaralar1, y 48 ó 72 horas después las células GFP positivas (GFP⁺) se separaron mediante FACS-sorter. Mediante western blot, se cuantificó el grado de *knock-down* de la proteína aralar que se obtuvo en la fracción de células GFP⁺ con cada uno de los *cassettes* shRNA. B. El *cassette* shRNA A6 se introdujo mediante clonaje en el vector pSUPER, y el vector shRNA pSUPER, se transfectó en las células INS-1 para generar la línea aralar KD. Los vectores FLAG-tagged-pIRESaralar1 o FLAG-tagged-pIRESaralar1Mut se transfectaron en la línea aralar KD para generar las líneas Wt 24 y Mut 37, respectivamente.

codifica la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) y 48 o 72 horas después de la co-transfección, se separaron las células en las que se detectaba la expresión de la proteína GFP (células GFP⁺) del resto de células mediante FACS-sorter. La relación de los vectores shRNA.pCRII-TOPO y CMV-GFP-IRES-hyg fue de 1:0.33 (shRNA:GFP).

En la figura 17A se muestra el porcentaje de células que resultaron ser GFP⁺ en los experimentos a las 48 o 72 horas tras la co-transfección, que representaba un $33,77 \pm 1,64$ y un $34,65 \pm 2,57$ % respectivamente, del total de células transfectadas. La fracción de células GFP⁺ separada por FACS-sorter se analizó por western blot en cada uno de los casos (figura 17B) y se cuantificó mediante densitometría de bandas la relación entre aralar y el control de carga β -F₁ATPasa mitocondrial. En la figura 17C están representados las razones aralar/ β -F₁ATPasa de cada uno de los *cassettes* shRNA normalizado en porcentaje respecto a la

razón aralar/ β -F₁ATPasa de las células HEK 293 pIRESaralar1 sin transfectar.

Las razones aralar/ β -F₁ATPasa eran $58,54 \pm 22,85$, $49,43 \pm 11,81$ y $40,04 \pm 16,00$ a las 48 horas y $67,28 \pm 26,25$, $50,35 \pm 5,77$ y $33,70 \pm 16,25$ a las 72 horas, para los *cassettes* shRNA A2, A3 y A6, respectivamente. Las células que expresaban el *cassette* shRNA A6 fueron las que presentaron la menor relación aralar/ β -F₁ATPasa, tanto a las 48 como a las 72 horas después de la transfección.

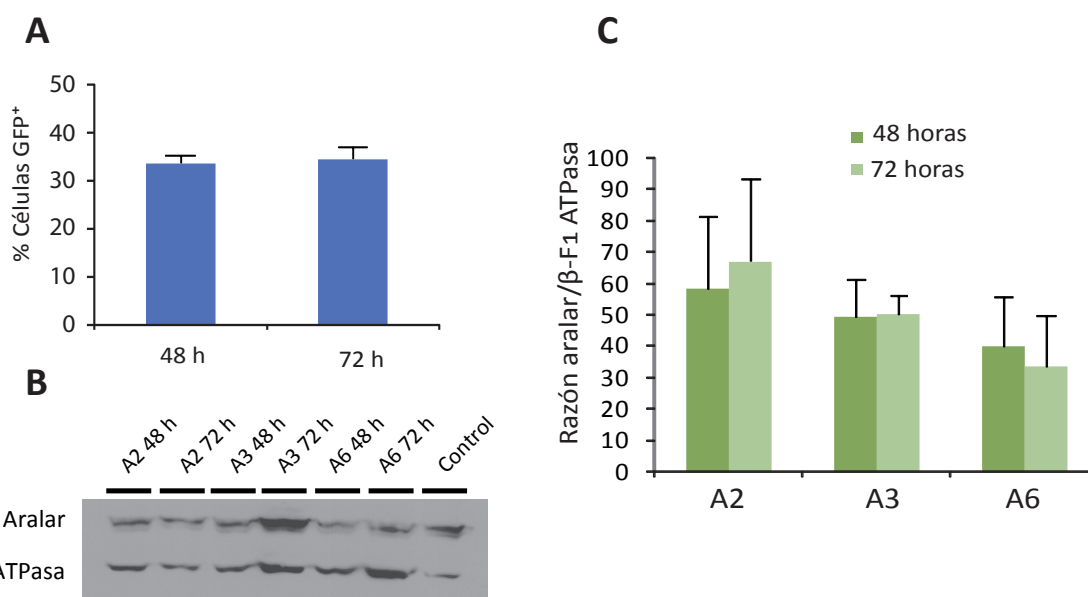


Figura 17. Eficiencia de los diferentes *cassettes* shRNA para disminuir los niveles de la proteína aralar en la línea celular HEK 293 pIRESaralar1. A. Porcentaje de células GFP positivas (GFP⁺) analizadas y separadas mediante FACS-sorter 48 ó 72 horas después de la co-transfección de las células HEK 293 pIRESaralar1 con los plásmidos shRNA.pCRII-TOPO A2, 3 o 6 y CMV-GFP-IRES-hyg. Los datos representan la media \pm SEM de 14 experimentos para el tiempo de 48 horas y de 8 experimentos para el tiempo de 72 horas. B. Expresión de aralar en células HEK 293 co-transfectadas con los plásmidos shRNA.pCRII-TOPO A2, 3 o 6 y CMV-GFP-IRES-hyg y separadas por FACS-sorter 48 ó 72 horas después. Se cargaron 20 μ g de proteína por carril y tras electroforesis en SDS-poliacrilamida al 8 % se analizó mediante western blot la inmunorreacción frente a los anticuerpos anti-aralar (1:5.000) y anti- β -F₁ATPasa (1:10.000). C. Relación aralar/ β -F₁ATPasa para cada uno de las *cassettes* shRNA en las células HEK 293 pIRESaralar1. En la gráfica están representadas las respectivas razones, para las cuales primero se normalizó la expresión de cada una de las proteínas respecto a la expresión en las células sin transfectar. Los valores representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Idealmente, el agente de RNAi empleado no debe causar ningún otro efecto además de aquellos relacionados con el *knock-down* del gen diana. En trabajos anteriores se han observado inducciones no específicas causadas por la transfección con siRNAs (Persengiev *et al.*, 2004; Semizarov *et al.*, 2003). Se trata de respuestas celulares que podrían ser dependientes de la concentración de siRNAs. Teniendo en cuenta estos datos, para evitar efectos indeseables de inducción/ represión no específica y dependientes de concentración, que podrían llevar a conclusiones erróneas acerca de los efectos del *knock-down* de la proteína, se disminuyó la concentración del plásmido shRNA.

La disminución de la concentración del plásmido shRNA.pCII-TOPO A6 a la mitad ($2 \mu\text{g}/10 \times 10^6$ células), dio lugar claramente a un mayor porcentaje de *knock-down* en la proteína aralar 72 horas después de la transfección (figura 18A).

Aunque la secuencia elegida en el RNAm de aralar para construir el *cassette* shRNA A6 era específica, era importante comprobar que la expresión de citrina (AGC2), la otra isoforma del AGC presente en la línea HEK 293 (Palmieri *et al.*, 2001), no se veía afectada por el *knock-down* de aralar. Además, se comprobó la expresión de otras proteínas de la célula, tanto citosólicas, β -actina; como mitocondriales, la isoforma 1 de los SCaMC. Según se observa en la figura 18 ni la expresión de citrina ni la de los otros marcadores testados estaba modificada por el *knock-down* de aralar.

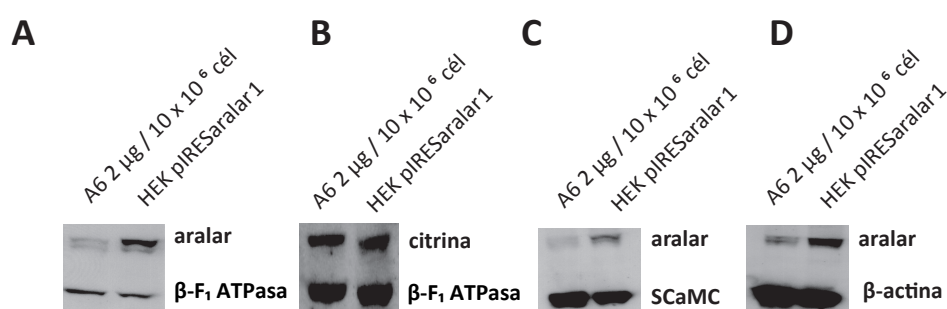


Figura 18. Expresión de aralar, citrina y otros marcadores en las células HEK 293 pIRESalar1 transfectadas con el vector shRNA.pCII-TOPO A6 ($2 \mu\text{g}/10 \times 10^6$ células). En todos los casos se cargaron $20 \mu\text{g}$ de proteína por carril y tras electroforesis en SDS-poliacrilamida al 8 % se analizó mediante western blot la inmunorreacción frente a los anticuerpos (A) anti-alarar (1:5.000) y anti- β -F₁ATPasa (1:10.000) como control de carga mitocondrial, (B) anti-citrina (1:500) y anti- β -F₁ATPasa (1:10.000), (C) anti-alarar (1:5.000) y anti-sCaMC-1 (1:5000), (D) anti-alarar (1:5.000) y anti- β -actina (1:5.000).

Por presentar la mayor eficiencia en el *knock-down* y especificidad contra la isoforma adecuada, se eligió el *cassette* shRNA A6 para generar una línea estable derivada de las células INS-1 (Asfari *et al.*, 1992) con los niveles de aralar disminuidos.

1.2. Disminución de los niveles de aralar mediante RNAi en células INS-1

Tanto la línea celular INS-1, como las células- β primarias de rata, sólo expresan aralar (AGC1) como isoforma del AGC y no expresan citrina (AGC2) (Rubi *et al.*, 2004).

El *cassette* shRNA A6 se introdujo mediante clonaje en el vector pSUPER, para dar lugar al vector aralar shRNA.pSUPER, que contenía el *cassette* shRNA A6 y un gen de resistencia al antibiótico puromicina, dispuestos de manera bidireccional (según se detalla en el apartado 1.1. de Materiales y Métodos). Las células INS-1 (Asfari *et al.*, 1992) se transfectaron con el vector shRNA.pSUPER, o con el vector *empty* pSUPER (vector pSUPER sin el *cassette* shRNA A6). Aproximadamente tres semanas después de la transfección se aislaron clones que eran resistentes a puromicina, un total de 56 clones

para las células transfectadas con el vector shRNA.pSUPER y un total de 20 clones para las células transfectadas con el vector *empty* pSUPER. Las líneas celulares establecidas se analizaron mediante western blot. Uno de los diferentes clones para aralar shRNA.pSUPER en el que los niveles de la proteína aralar eran indetectables en todos los pases celulares testados, se seleccionó como la línea celular aralar *knock-down* (aralar KD) utilizada en este estudio (figura 19A). En la figura 19B está cuantificada la expresión de la proteína endógena aralar en la línea que expresa de manera estable el vector *empty* pSUPER respecto a la expresión endógena en la línea INS-1 nativa. La expresión de aralar en las células INS-1 no se vió modificada a lo largo del tiempo como consecuencia de algún efecto inespecífico conferido por el vector *empty* pSUPER.

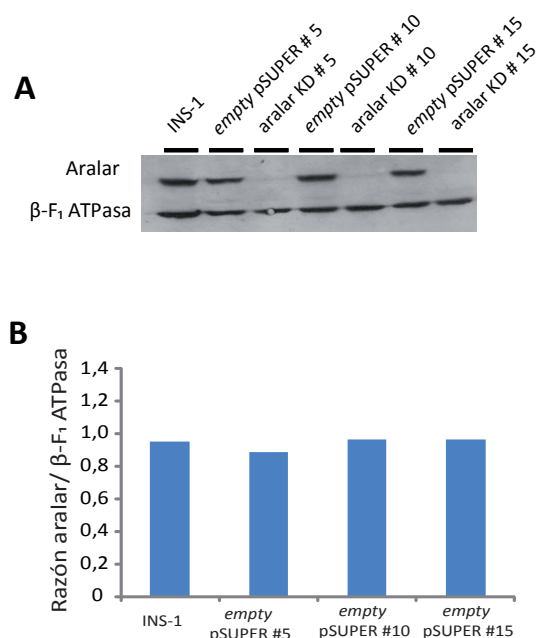


Figura 19. Knock-down de aralar en las células INS-1. A. Análisis por western blot para células INS-1, *empty* pSUPER y aralar KD tras diferentes pases (indicados por los números en la parte superior). Se cargaron 20 µg de proteína por carril y tras electroforesis en SDS-poliacrilamida al 8 % se analizó mediante western blot la inmunorreacción frente a los anticuerpos anti-aralar (1:5.000) y anti-β-F₁ATPasa (1:10.000). B. Razón aralar/β-F₁ATPasa en las células INS-1 sin transfectar o en células que expresan de manera estable el vector *empty* pSUPER a diferentes pases celulares.

1.3. Reconstitución de la expresión de aralar nativo en células INS-1

El control último en cualquier experimento de RNAi es el rescate mediante la expresión del gen diana en una forma refractaria al *knock-down*. Esta aproximación se considera un estándar aceptable en los experimentos de RNAi (Editorial *Nat Cell Biol*, 2003).

Para rescatar la expresión de aralar de manera permanente en las células INS-1, la estrategia seguida fue transfectar las células con un plásmido resistente a la degradación por

RNAi, que contenía la secuencia de aralar fusionada a un epítipo FLAG, como se detalla en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos. La reacción de degradación del RNA diana guiada por los siRNAs es altamente secuencia-específica. No obstante, no todas las posiciones de un siRNA contribuyen de igual manera al reconocimiento de la secuencia diana en el RNAm. El cambio de uno o más nucleótidos en el centro de la secuencia reconocida por el complejo de RNAi son las más críticas y dan lugar a una reducción o pérdida total de la capacidad de reconocimiento de la secuencia diana en el RNAm (Elbashir *et al.*, 2002).

Se diseñaron tres mutaciones puntuales en el centro de la secuencia reconocida por el shRNA A6, como se indica en la figura 20A y se introdujeron mediante mutagénesis dirigida en la secuencia codificante de aralar del vector pIRESaralar1, para generar el vector FLAG-taggedpIRESaralar1 según se detalla en el apartado 1.2. de Materiales y Métodos.

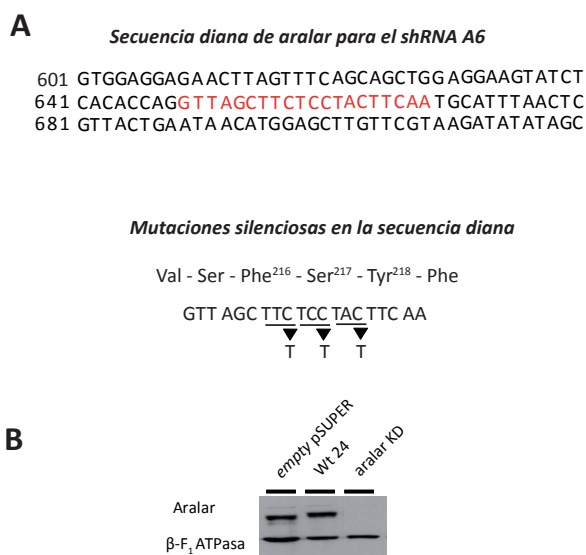


Figura 20. Rescate de la expresión de aralar en la línea aralar KD. A. En la parte superior está representado un fragmento parcial de la secuencia de nucleótidos de aralar en humano clonada en el vector FLAG-tagged pIRESaralar1. En rojo está resaltada la región de nucleótidos contra la que está dirigida el shRNA. La secuencia diana en fase codifica los aminoácidos Val-Ser-Phe-Ser-Tyr-Phe y se introdujeron mutaciones puntuales en la tercera base de los codones de los aminoácidos Phe²¹⁶, Ser²¹⁷ y Tyr²¹⁸ como se indica en el esquema. B. Expresión de aralar en células empty pSUPER, Wt 24 y aralar KD. Se cargaron 20 µg de proteína por carril y tras electroforesis en SDS-poliacrilamida al 8 % se analizó mediante western blot la inmunorreacción frente a los anticuerpos anti-aralar (1:5.000) y anti-β-F₁ATPasa como control de carga mitocondrial (1:10.000).

El vector FLAG-taggedpIRESaralar1 se transfectó en la línea aralar KD y aproximadamente tres semanas después de la transfección se aislaron 48 clones con resistencia al antibiótico higromicina, conferida por el gen de resistencia a higromicina que contiene el vector FLAG-taggedpIRESaralar1 derivado de pIRESaralar1, y se establecieron líneas celulares. La expresión de aralar en los diferentes clones se analizó mediante western blot, y se eligió aquella línea, denominada Wt 24, que tenía la relación de expresión aralar/β-F₁ATPasa más similar a aquella que presentaba la línea INS-1 sin transfectar, como se muestra en la figura 20.

1.4. Mutagénesis de los motivos EF de aralar

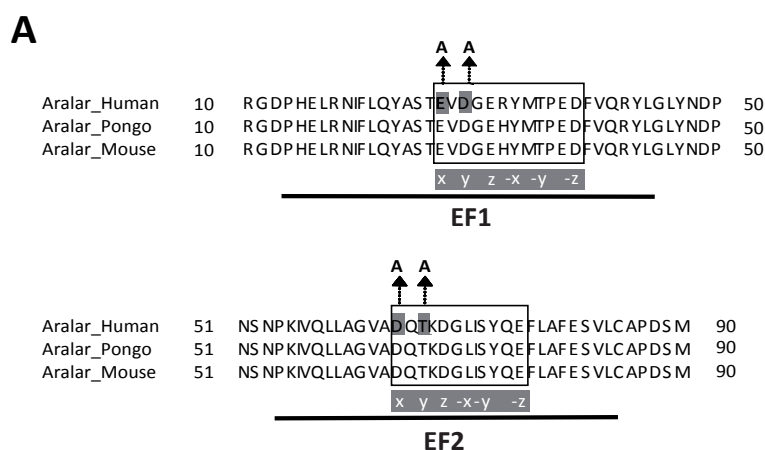
La predicción de las características funcionales de los motivos EF en la secuencia de aralar ha sido estudiada por Laura Contreras (Contreras *et al.*, 2007) mediante un modelo por homología de la región N-terminal. Aralar contiene 4 pares de motivos EF, y un noveno motivo EF vestigial (EF9) que se postula no-funcional, y todos ellos se encuentran en los primeros 330-340 aminoácidos de la secuencia. Se predice que el único par de motivos EF canónico y funcional está compuesto por los motivos EF1 (residuos 13-46 de aralar humano) y EF2 (residuos 54-84 en aralar humano).

Además, estudios previos de delección de la región N-terminal y de unión a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ con la isoforma citrina/AGC2 (Del Arco *et al.*, 2000), sugieren que la unión a Ca^{2+} está conferida principalmente por este par EF1-EF2.

Para estudiar la regulación por Ca^{2+} de aralar, se introdujeron mutaciones específicas en la secuencia de aralar previamente introducida en el vector FLAG-taggedpIRESaralar1, para interferir con su capacidad de unir Ca^{2+} en el espacio intermembrana, según se muestra en la figura 21A, dando así lugar al vector FLAG-taggedpIRESaralar1Mut. Los aminoácidos que contribuyen a la geometría del enlace de coordinación de unión a Ca^{2+} están marcados x , y , z , $-x$, $-y$, y $-z$ (Del Arco *et al.*, 2000; del Arco y Satrustegui, 1998). Para bloquear la unión a Ca^{2+} de aralar, los residuos conservados glutamato (Glu) y aspartato (Asp) en las posiciones 27 y 29 del motivo EF1 (posiciones x e y , respectivamente), y los residuos conservados aspartato (Asp) y treonina (Thr) en las posiciones 65 y 67 del motivo EF2 (posiciones x e y , respectivamente) de aralar, se reemplazaron por alaninas (Ala) mediante mutagénesis dirigida para dar lugar a una proteína FLAG-tagged aralar mutada.

1.5. Reconstitución de la expresión de aralar mutado en células INS-1

El vector FLAG-tagged-pIRESaralar1Mut se transfectó en la línea aralar KD y aproximadamente tres semanas después de la transfección, se aislaron 48 clones resistentes a higromicina y se establecieron líneas celulares estables. De estas líneas se eligió una, la línea celular (Mut 37), en la que los niveles de proteína aralar son similares a los que expresa la línea Wt 24, según mostró el análisis mediante western blot contra el anticuerpo anti-FLAG (figura 21B). La detección de los niveles de aralar mediante el anticuerpo anti-aralar en la línea Mut 37 no fue posible debido a que la proteína mutada que se expresaba dejó de ser reconocida por dicho anticuerpo, el cual está dirigido contra los aminoácidos 12-332 (Del Arco *et al.*, 2000), en la región N-terminal de aralar (figura 21B, tercer carril Mut 37). Los niveles de expresión de las proteínas nativa y mutada de aralar fusionadas al epítipo FLAG, medidos como la razón $\text{FLAG}/\beta\text{-F}_1\text{ATPasa}$, eran $3,045 \pm 0,23$ y $3,063 \pm 0,21$, en las células Wt 24 y Mut 37, respectivamente, como se muestra en la figura 21C. La semejanza entre los niveles de expresión alcanzados por ambas proteínas en células INS-1



Mutaciones de cambio de aminoácido en los motivos EF

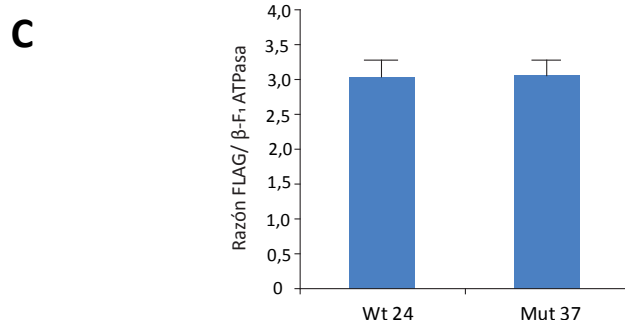
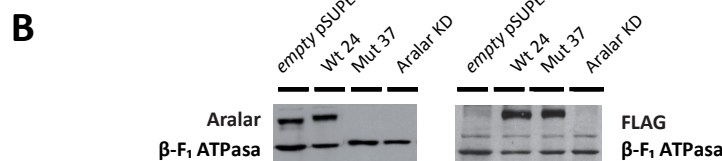
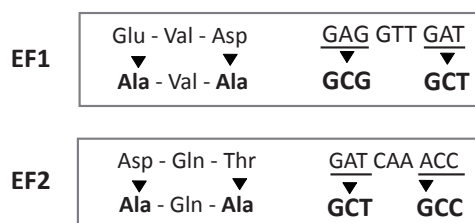


Figura 21. Generación de aralar mutado en los motivos EF que unen Ca^{2+} y de la línea Mut 37.
A. Alineamiento del dominio N-terminal de secuencias representativas de aralar (de humano, orangután y ratón). Los rectángulos indican la posición de los bucles estructurales que se predice que son funcionales en términos de unión de Ca^{2+} . Los aminoácidos que contribuyen a la formación del enlace de coordinación octaédrico están marcados como x, y, z, -x, -y, -z. Los residuos en las posiciones 27 y 29 del motivo EF1 (Glu y Asp, respectivamente), y los residuos en las posiciones 65 y 67 del motivo EF2 (Asp y Thr, respectivamente) se mutaron de manera individual a alanina (Ala) para impedir la unión funcional a Ca^{2+} de los motivos EF respectivos. B. Western blot para aralar (1:5.000), FLAG (1:5.000) y β -F1ATPasa (1:10.000) en células INS-1 Wt 24, Mut 37, *empty* pSUPER y aralar KD. En todos los casos se cargaron 20 μg de proteína por carril y tras electroforesis en SDS-poliacrilamida al 8 % se analizó mediante western blot la inmunorreacción frente a los anticuerpos correspondientes. C. Comparación de la expresión FLAG/ β -F1 ATPasa en células Wt 24 y Mut 37. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

hace que ambas líneas celulares generadas, Wt 24 y Mut 37, pudiesen ser completamente comparables en experimentos posteriores. Las células INS-1 *empty* pSUPER y Wt 24 expresaban unas razones aralar/ β -F₁ ATPasa similares entre ellas, que fueron 0,774 y 1,067, respectivamente.

2. Medida de la actividad MAS en mitocondrias de células INS-1 aralar KD

El ensayo de reconstitución de la lanzadera de NADH malato-aspartato se hizo con la fracción mitocondrial cruda (P2) de células Wt 24, aralar KD y Mut 37 según se detalla en el apartado 5 de Materiales y Métodos. La competencia respiratoria de las mitocondrias aisladas se comprobó con un electrodo tipo Clark en estado 3 y estado 4 según se detalla en el apartado 5 de Materiales y Métodos.

2.1. Efecto del aspartato en la reconstitución de la actividad MAS

En primer lugar, se reconstituyó la lanzadera en presencia de 5 mM aspartato en el medio de ensayo (Contreras *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2006). Se utilizó una dosis de rojo de rutenio (RR) de 200 nM (Martinez-Serrano y Satrustegui, 1992), la dosis efectiva para impedir la entrada de Ca²⁺ en la mitocondria en ensayos de captura de Ca²⁺ con mitocondrias de cerebro y músculo de ratón (Pardo *et al.*, 2006).

Los experimentos se realizaron en presencia de ADP, que es la condición en la cual la actividad MAS es mayor.

La actividad MAS en mitocondrias aisladas de células Wt 24 y aralar KD fue de $41,20 \pm 5,68$ y $12,98 \pm 3,21$ nmol de NADH \cdot min⁻¹ \cdot mg de proteína⁻¹, respectivamente. Aunque se observó una reducción de más del 60 % en la actividad MAS en mitocondrias de células aralar KD respecto a la que tenía lugar en células Wt 24, cabría esperar una actividad menor o despreciable en células aralar KD, en consonancia con el nivel indetectable de proteína aralar en las células aralar KD, y según trabajos anteriores de reconstitución de la lanzadera en tejidos defectivos en aralar (Jalil *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2006). Sin embargo, en célula- β existe otra vía de entrada de glutamato en la mitocondria adicional al AGC (Casimir *et al.*, 2009a; Fiermonte *et al.*, 2002). El glutamato entonces podría ser convertido a α -KG dentro de la mitocondria por la glutamato deshidrogenasa (GDH), generando NADH en la mitocondria y la presencia de aspartato externo en el medio permitiría que éste se pudiese transaminar con el α -KG que sale por el transportador de malato/ α -KG (OGC), dando lugar a glutamato y OAA. El OAA se reduciría a malato por la malato deshidrogenasa y consumiría NADH externo, y por lo tanto, se podría prescindir del AGC. Por ello, a diferencia de lo que ocurre

en cerebro (Pardo *et al.*, 2006), la reconstitución de la lanzadera en células- β no puede hacerse con aspartato en el medio.

2.2. Reconstitución de la actividad de la lanzadera en ausencia de aspartato

En los siguientes ensayos se omitió el aspartato del medio de ensayo, y se realizaron en presencia de ADP y RR. En células Wt 24, la desaparición de NADH dependiente de glutamato (medida de MAS) es mucho mayor que en las aralar KD, en las que de hecho, no se produce desaparición alguna (figura 22, B, C y D).

En células Wt 24 la adición de glutamato dio lugar a un aumento pequeño y reversible en la fluorescencia del NADH del medio tras añadir glutamato, lo que indicaba una producción inicial de NADH por las reacciones de la lanzadera (figura 22B). Este pequeño aumento inicial en la fluorescencia de NADH no se debía a un efecto inespecífico, ya que en ausencia de glutamato, la curva de disminución de NADH en células Wt 24 no cambiaba de pendiente (figura 22A).

Este pequeño aumento reflejaba, muy probablemente, una reversión inicial de la reacción de la malato deshidrogenasa hacia la formación de NADH, que tendría lugar hasta que hubiese salido suficiente aspartato de la mitocondria y por tanto, permitiese que la reacción de la transaminasa procediese en la dirección de la producción de OAA, acoplada a la oxidación de NADH.

Resultados

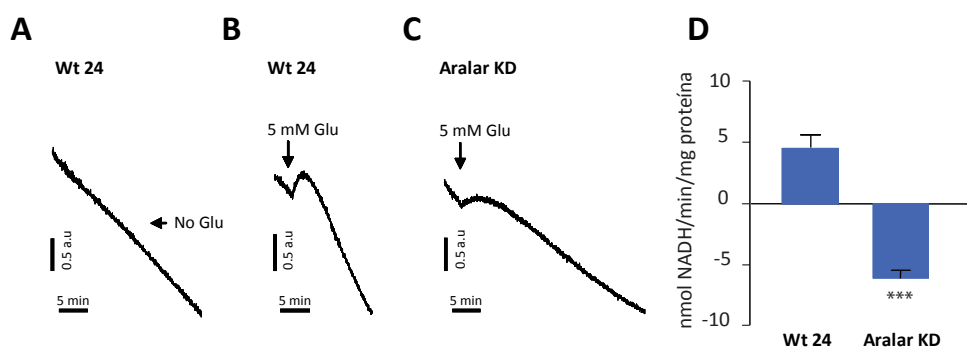


Figura 22. Efecto del *knock-down* de aralar en la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS) en mitocondrias aisladas de células INS-1. La actividad MAS fue medida en preparaciones de mitocondrias de las líneas celulares Wt 24 y aralar KD como el descenso en la fluorescencia del NADH, sin la adición de glutamato (Glu) (A) o tras la adición de glutamato (B y C), cuando se indica con las flechas. Las curvas corresponden a experimentos representativos. D. Actividad MAS de las líneas Wt 24 y aralar KD medida en nmoles NADH/min/mg de proteína. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos realizados en duplicado o triplicado. Se indican las diferencias significativas respecto a las células Wt 24 (***, $p < 0.001$, *unpaired t-test*).

3. Efecto de aralar KD en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Los equivalentes redox generados en la glicolisis y en el metabolismo mitocondrial por la fracción del piruvato derivado de la glucosa que se oxida en la mitocondria, entran

en la cadena respiratoria, y generan un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$), con el resultado de la hiperpolarización de la membrana mitocondrial, el pre-requisito para la generación de ATP.

Para determinar diferencias en la hiperpolarización de la membrana mitocondrial inducida por glucosa en las células aralar KD y Wt 24, se midió el $\Delta\psi\text{m}$ en células intactas a nivel de población (según se describe en el apartado 8 de materiales y métodos). Con este fin se usó la sonda fluorescente sensible a $\Delta\psi\text{m}$ rodamina 123 (rh123), en el modo *quench/dequench* (Duchen *et al.*, 2003).

En esta modalidad las células se cargan con concentraciones relativamente altas de la sonda rh123. Según se acumula la sonda en la mitocondria, se alcanzan concentraciones a las cuales se forman agregados que no son fluorescentes (*quench*). La redistribución de la sonda en el citosol según se despolariza la mitocondria hace que la señal de fluorescencia aumente (*dequench*). Por lo tanto, en este modo, un aumento en la fluorescencia indica despolarización de $\Delta\psi\text{m}$, como se muestra en la figura 23, tras la adición del desacoplante mitocondrial carbonilcianuro de p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 1 μM) que disipa el gradiente de H^+ .

Tanto en células aralar KD como en células Wt 24, la membrana mitocondrial se hiperpolarizó en respuesta a 15 mM glucosa según se muestra en la figura 23. Durante la hiperpolarización se alcanzó una fase *plateau* tras aproximadamente 2 minutos, en consonancia con lo que se ha observado previamente para medidas de $\Delta\psi\text{m}$ en células INS-1 cargadas con rh123 (Merglen *et al.*, 2004; Rubi *et al.*, 2004).

La fluorescencia de rh123 (F) se normalizó respecto a la fluorescencia máxima (Fmax)

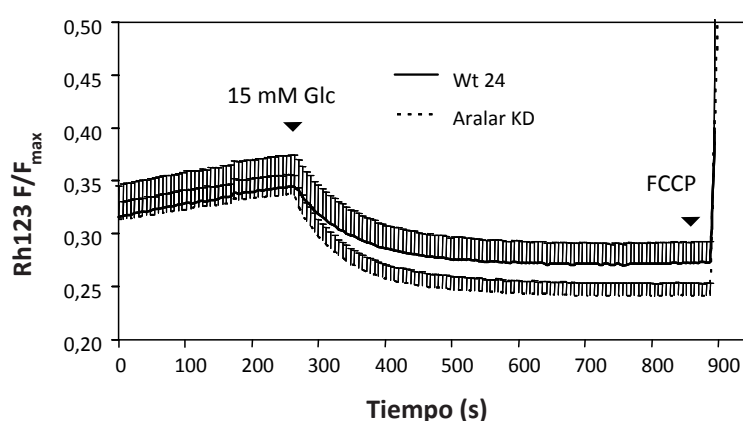


Figura 23. Efectos del knock-down de aralar en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$). El potencial de membrana mitocondrial se midió en células adheridas aralar KD y Wt 24 usando la fluorescencia de la sonda rodamina 123 (Rh123). La activación de la cadena de transporte electrónico, observada como la hiperpolarización de $\Delta\psi\text{m}$ fue inducida por 15 mM glucosa (Glc) seguida por una despolarización de $\Delta\psi\text{m}$ con 1 μM del desacoplante FCCP. No se encontraron diferencias significativas entre las células aralar KD y Wt 24 cuando se compararon diferentes puntos a lo largo de la curva (0, 174, 294, 414, 534, 654, y 774 s; *unpaired t-test*). Los datos representan la media \pm SEM de 4 curvas independientes.

obtenida tras la adición de FCCP (F/Fmax) en cada una de las líneas. No se encontraron diferencias significativas entre las células aralar KD y Wt 24 cuando se compararon los valores para F/Fmax de rh123 en diferentes puntos de la curva, tanto en el $\Delta\psi_m$ basal, como tras la adición de 15 mM glucosa (tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los valores de hiperpolarización de $\Delta\psi_m$ en respuesta a 15 mM glucosa en células Wt 24 y aralar KD.

	Wt 24	Aralar KD	
Tiempo (s)	$\Delta\psi_m$, Rh123 F/Fmáx		
0	0,316 ± 0,03	0,314 ± 0,017	BASAL
174	0,339 ± 0,03	0,333 ± 0,019	
294	0,322 ± 0,028	0,302 ± 0,017	15 mM Glc
414	0,284 ± 0,022	0,256 ± 0,013	
534	0,275 ± 0,021	0,246 ± 0,012	
654	0,272 ± 0,020	0,243 ± 0,012	
774	0,272 ± 0,020	0,242 ± 0,012	

No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon diferentes puntos a lo largo de la curva (0, 174, 294, 414, 534, 654, y 774 s; *unpaired t-test*). Los datos representan la media ± SEM de 4 curvas independientes.

4. Efecto de aralar en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria inducida por glucosa

En el modelo vigente, el ATP generado a partir de la estimulación por glucosa se une a canales de K^+ dependientes de ATP (canales K^+_{ATP}), produciendo una despolarización de la membrana plasmática y la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (canales VDCC) (Wiederkehr y Wollheim, 2008). La entrada masiva de Ca^{2+} en el citosol se transmite a la mitocondria, donde el Ca^{2+} entra a través del uniportador de Ca^{2+} . Esta entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es dependiente del $\Delta\psi_m$, que, como se ha visto, no se modifica por la ausencia de aralar. En las líneas Wt 24 y aralar KD se registraron aumentos similares de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ (figura 29, A y B) y tiempos similares para la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, medidos desde el momento de estimulación con 15 mM glucosa hasta que se alcanzaron los niveles máximos de $[\text{Ca}^{2+}]_m$, de acuerdo con la igualdad en la polarización mitocondrial inducida por glucosa en estas líneas (figura 23). El Ca^{2+} tardó $28,75 \pm 2,63$ segundos en entrar a la mitocondria tras la estimulación con glucosa en células Wt 24 intactas que expresaban aequorina mitocondrial, y $29,80 \pm 3,40$ segundos en las células aralar KD. Tampoco la concentración final de Ca^{2+} mitocondrial pareció verse afectada por la expresión de aralar (Rubi *et al.*, 2001). La falta de efectos de aralar KD en el $\Delta\psi_m$ (figura 23) y $[\text{Ca}^{2+}]_m$ (figura 29, A y B) inducidos por glucosa es sorprendente. Para explorar en más detalle el papel de

MAS en el aumento de $[Ca^{2+}]_m$, se realizaron experimentos con aminooxiacetato.

El aminooxiacetato (AOA) es un inhibidor de MAS comúnmente usado en célula- β (Eto *et al.*, 1999; Ishihara *et al.*, 1999; MacDonald, 1982; Malaisse *et al.*, 1982; Palmieri *et al.*, 2001). El AOA inhibe a las transaminasas y por lo tanto, bloquea la reoxidación de NADH por MAS. La célula- β , y en concreto la línea de células- β INS-1, presenta una alta sensibilidad al tratamiento con AOA comparada con otros tejidos. En estas células se ha probado que 0,25 mM AOA es una concentración efectiva para inhibir MAS (Ishihara *et al.*, 1999). Para determinar la sensibilidad a AOA de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria inducida por glucosa, se incubaron las células con 0,25 (figura 24A) o 1 mM AOA (figura 24B). Como se observa en el primer panel de la figura 24A, la presencia de aralar confirió una sensibilidad a AOA, lo que se reflejaba en una entrada retardada de Ca^{2+} en la mitocondria, algo que no ocurría en las células aralar KD (segundo panel de la figura 24A). Aunque las concentraciones máximas de Ca^{2+} se igualaban con el tiempo; sin embargo, la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria de las células aralar KD perdió la sensibilidad a AOA, aunque mantuvieron la entrada máxima. Con una concentración superior de AOA (1 mM) (figura 24B) se apreció un retraso en la entrada de Ca^{2+} en ambas líneas celulares, aunque ligeramente mayor en presencia de aralar, posiblemente debido al efecto del AOA sobre otras transaminasas.

Estos resultados sugieren que en las células que expresan aralar existe un componente

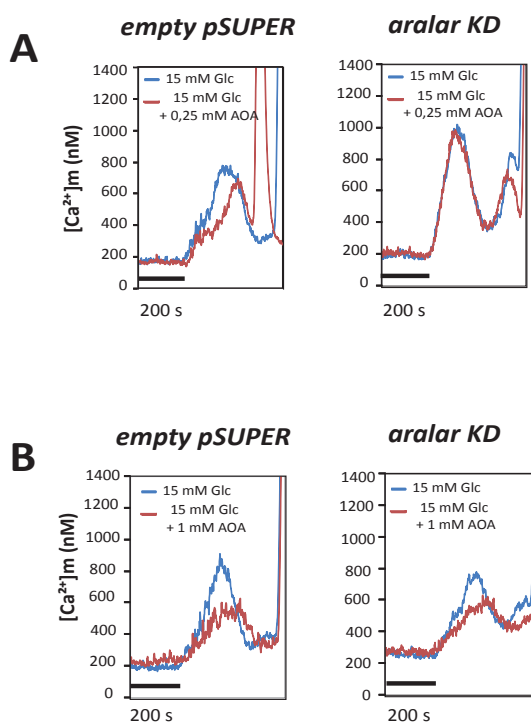


Figura 24. Sensibilidad a aminooxiacetato (AOA) de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria inducida por glucosa en células INS-1 empty pSUPER y aralar KD. Las células empty pSUPER y aralar KD que expresaban aequorina se estimularon con 15 mM glucosa (Glc) y 15 mM Glc + 0.25 mM aminooxiacetato (A) o 15 mM glucosa (Glc) y 15 mM Glc + 1 mM AOA (B). Las curvas son experimentos representativos.

en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria susceptible de ser inhibido por AOA, que se habría perdido en células aralar KD. Como estas células mantienen tanto el $\Delta\psi_m$, como la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, a pesar de haber perdido la sensibilidad a AOA; es posible que hayan desarrollado algún mecanismo compensatorio (por ejemplo, la sobreexpresión de la mGPD), hecho que se ha observado en el cerebro de ratones *Aralar^{-/-}* (Contreras *et al.*, resultados no publicados), y que necesita ser estudiado con mayor detalle.

5. Efecto de aralar KD en la secreción de insulina inducida por glucosa (GSIS)

La glucosa es el secretagogo fisiológico más potente en las células- β pancreáticas, y estimula la secreción de insulina vía glicolisis aerobia (Wiederkehr y Wollheim, 2008).

La secreción de insulina en respuesta a una concentración de glucosa estimulatoria (15 mM) se analizó en células Wt 24 y aralar KD durante un período de estimulación de 30 minutos, y se expresó como el % de insulina secretada respecto al contenido total de insulina (figura 25 y tabla 6). A concentraciones basales de glucosa (2.5 mM glucosa), las células Wt 24 liberaron un $2,28 \pm 0,8$ % de insulina respecto al contenido. Concentraciones de glucosa estimulatorias (15 mM) provocaron un aumento en la secreción de insulina: $9,86 \pm 0,92$ % respecto al contenido ($p < 0,001$).

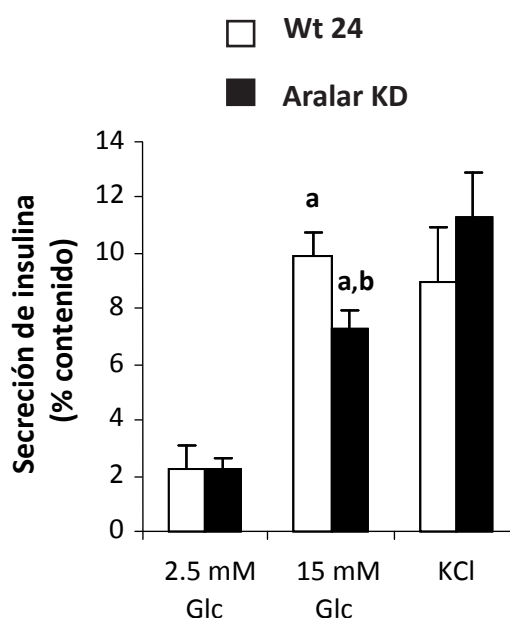


Figura 25. Efectos del *knock-down* de aralar en la secreción de insulina. Las células Wt 24 (barras blancas) y aralar KD (barras negras) se cultivaron en placas de 24 pocillos y el experimento se realizó 48 horas después de la siembra. Las células se incubaron durante 30 min con 2,5 o 15 mM glucosa (Glc), o 30 mM KCl (con 2,5 mM glucosa). Los datos representan la media \pm SEM de 2 o 3 experimentos independientes realizados por duplicado o triplicado. Se indica la diferencia significativa respecto a las células Wt 24 a 15 mM glucosa (*, $p < 0,05$, *unpaired t-test*).

En comparación con las células Wt 24, la respuesta secretora en las células aralar KD se atenuó un 25,7 % ($p < 0,05$) (de $2,20 \pm 0,43$ a 2,5 mM glucosa a $7,33 \pm 0,64$ % del contenido, a 15 mM glucosa, $p < 0,001$) (figura 25). No obstante, la insulina liberada como respuesta al estímulo de 30 mM KCl, que rápidamente despolariza la membrana de la célula- β e incrementa el influjo de Ca^{2+} de manera independiente al metabolismo mitocondrial (Kennedy *et al.*, 1998), fue el mismo en las dos líneas celulares (figura 25).

Además, la secreción de insulina en respuesta a glucosa y KCl no fue significativamente diferente en células Wt 24 o en células INS-1 nativas transfectadas con el vector *empty* pSUPER. El contenido celular de insulina en células aralar KD no está afectado en comparación con las células Wt 24 ($62,8 \pm 4,4$ y $69,1 \pm 10,2$ ng de insulina/ml para células Wt 24 y aralar KD, respectivamente).

Tabla 6. Secreción de insulina y contenido total en las líneas aralar KD, Wt 24 y Mut 37.

Línea celular	Secreción de insulina (% respecto a contenido total)			Contenido total de insulina (ng/ml)
	2,5 mM Glucosa	15 mM Glucosa	30 mM KCl	
Aralar KD	$2,20 \pm 0,43$	$7,33 \pm 0,64^*$	$11,27 \pm 1,58$	$69,1 \pm 10,2$
Wt 24	$2,28 \pm 0,80$	$9,86 \pm 0,92$	$8,99 \pm 1,90$	$62,8 \pm 4,4$
Mut 37	$3,46 \pm 0,45$	$13,16 \pm 2,12$	$13,13 \pm 0,14$	$63,95 \pm 3,50$

Las células se incubaron durante 30 min con 2,5 o 15 mM glucosa (Glc), o 30 mM KCl (con 2,5 mM glucosa). Los datos representan la media \pm SEM de 1 -3 experimentos independientes realizados por duplicado o triplicado.

Resultados

En su conjunto, estos resultados muestran que la carencia de aralar disminuye GSIS a altas dosis de glucosa pero no a glucosa basal o con KCl en células- β INS-1 (figura 25 y tabla 6). Esto ocurre a expensas de una desaparición completa de la actividad MAS (figura 22D), aunque sin cambios en la hiperpolarización mitocondrial inducida por glucosa (tabla 5) o en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria (figura 24).

6. Activación por Ca^{2+} de la lanzadera de NADH malato-aspartato en mitocondrias aisladas

En tejidos donde aralar es la única isoforma del AGC, como cerebro y músculo esquelético, la actividad de MAS se activa por Ca^{2+} extramitocondrial con valores de $S_{0,5}$ de aproximadamente 300 nM. La estimulación por Ca^{2+} de MAS da lugar a un aumento en su V_{max} en tanto que no se producen cambios en la afinidad por su sustrato glutamato (Contreras *et al.*, 2007).

6.1. Activación por Ca^{2+} de la lanzadera en presencia de Rojo de Rutenio

Para estudiar la activación por Ca^{2+} de MAS en mitocondrias de célula- β INS-1, el ensayo de la actividad de la lanzadera (ver apartado 6 de Materiales y Métodos) se realizó en presencia de Ca^{2+} externo y rojo de rutenio (RR), el cual bloquea la toma de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas (Pardo *et al.*, 2006). Cualquier activación que se produzca por Ca^{2+} extramitocondrial en estas condiciones puede atribuirse a la regulación de aralar en la cara externa de la membrana mitocondrial interna (Contreras *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2006). La figura 26A muestra que la actividad MAS en mitocondrias aisladas de células Wt 24 aumentaba cuando había Ca^{2+} disponible en el medio de incubación. La máxima activación era de aproximadamente 2,5 veces en respuesta a Ca^{2+} extramitocondrial (de $4,49 \pm 1,11$ a $12,37 \pm 1,14$ nmol de NADH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$, en ausencia de Ca^{2+} (por debajo de 10 nM) o en presencia de 20 μM Ca^{2+} libre, respectivamente, ($p < 0,01$) (figura 26, B y D), similar a resultados obtenidos con mitocondrias de cerebro (Contreras *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2006).

6.2. Activación por Ca^{2+} de la lanzadera en ausencia de Rojo de Rutenio

En la figura 26B está representada la activación por Ca^{2+} externo en presencia o ausencia de 200 nM de RR. La ausencia de RR no modificó la activación de MAS, en consonancia con el hecho de que los sitios de activación por Ca^{2+} están en el espacio intermembrana. Estos resultados sugieren que en célula- β las vías aralar-MAS y CaU-mitDH no son mutuamente excluyentes, de manera similar a lo que ocurre en mitocondrias de hígado y a diferencia de la situación que tiene lugar en mitocondrias de cerebro y de corazón, en las que se produce una inhibición de la actividad MAS de una manera Ca^{2+} -dependiente cuando se permite la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a través del uniportador de Ca^{2+} (Contreras y Satrustegui, 2009). Probablemente este hecho se debe a que en mitocondrias de célula- β , existe una fuente adicional de α -KG, probablemente aportada por la enzima GDH a partir de glutamato, la cual tiene una alta actividad en mitocondrias de célula- β (Carobbio *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2003).

6.3. Papel de los motivos EF de aralar en la activación por Ca^{2+} de la lanzadera

Para estudiar el papel de los motivos EF de aralar en la activación de MAS, se realizaron ensayos de actividad de la lanzadera en mitocondrias de la línea celular Mut 37 (figura 26C). En estas mitocondrias, se abolió la estimulación por Ca^{2+} de la actividad MAS (de $6,64 \pm 0,77$ a $5,54 \pm 1,0$ nmol de NADH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$, en ausencia de Ca^{2+} (por debajo de 10 nM) o en presencia de 20 μM Ca^{2+} libre, respectivamente) (figura 26D). No obstante, la actividad basal de la lanzadera en un medio libre de Ca^{2+} fue el mismo que la de la línea Wt 24 (figura 26D).

Estos resultados muestran claramente que el par de motivos EF en el extremo N-terminal de aralar es responsable de la activación por Ca^{2+} de la actividad de la lanzadera, pero no se requiere para la actividad basal de MAS en condiciones libres de Ca^{2+} .

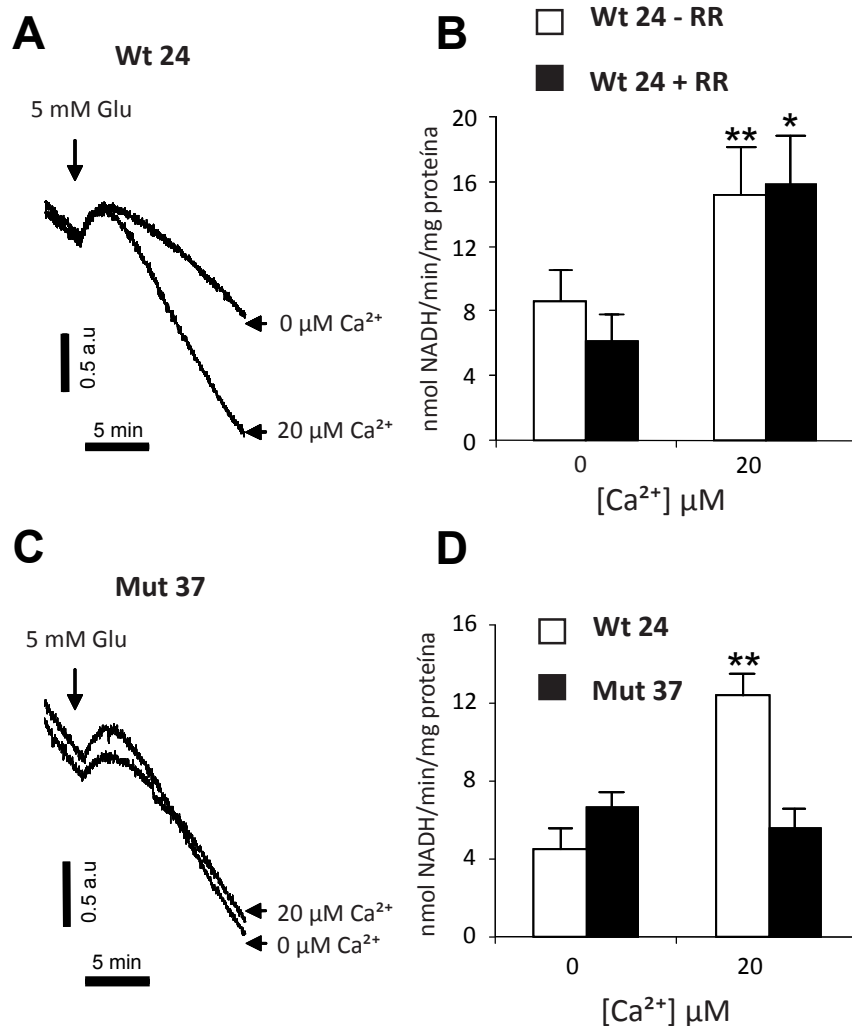


Figura 26. Activación por Ca^{2+} de la lanzadera malato-aspartato NADH (MAS) en mitocondrias aisladas.

A. La actividad MAS en preparaciones mitocondriales de la línea celular Wt 24 se estimó a partir del descenso de la fluorescencia del NADH tras la adición de glutamato (Glu) cuando se indica con las flechas. La variación de la actividad MAS se monitorizó a dos concentraciones de Ca^{2+} libre: 0 μM (i.e. por debajo de 10 nM) Ca^{2+} y 20 μM Ca^{2+} . B. Comparación entre la activación por Ca^{2+} de la línea celular Wt 24 en presencia de 0 μM Ca^{2+} (i.e. por debajo de 10 nM) y 20 μM Ca^{2+} en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de Rojo de Rutenio (RR) 200 nM. Los valores representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se indican las diferencias significativas respecto a la actividad basal (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; *paired t-test*). C. Actividad MAS en preparaciones de mitocondrias de la línea celular Mut 37 en presencia de 0 μM Ca^{2+} (i.e. por debajo de 10 nM) y 20 μM Ca^{2+} . Las curvas en los paneles A y C corresponden a experimentos representativos. D. Comparación entre la activación por Ca^{2+} de mitocondrias aisladas de las líneas celulares Wt 24 (barras blancas) o Mut 37 (barras negras) en presencia de 0 μM Ca^{2+} (i.e. por debajo de 10 nM) y 20 μM Ca^{2+} . Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. Se indican las diferencias significativas respecto a la actividad basal (**, $p < 0,01$, *unpaired t-test*).

7. Generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa

La célula- β depende en gran manera del metabolismo aerobio para la generación de ATP y otros factores “acoplantes” implicados en el acoplamiento de la secreción de insulina frente a un estímulo (Prentki, 1996; Prentki y Matschinsky, 1987), como es el NAD(P)H (Rocheleau *et al.*, 2002). En células- β , el aumento de NAD(P)H inducido por glucosa es principalmente de origen mitocondrial (Patterson *et al.*, 2000).

Los aumentos de NAD(P)H en la mitocondria pueden tener dos orígenes: 1. la acción de MAS que transfiere a la mitocondria el poder redox del NAD(P)H producido en la glicolisis, y 2. el metabolismo mitocondrial del piruvato derivado de la glicolisis en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) (Rocheleau *et al.*, 2002). La formación de NAD(P)H en la mitocondria se puede visualizar mediante la autofluorescencia de éste en células *in vivo*. Debido a que la lanzadera de glicerol-fosfato, que es la otra lanzadera que se expresa mayoritariamente en la célula- β (Eto *et al.*, 1999), transfiere los electrones del NADH citosólico al FAD^+ , que se reduce a FADH_2 ; no se espera que esta lanzadera aumente directamente los niveles de NAD(P)H mitocondrial (Rocheleau *et al.*, 2002).

Mediante microscopía multifotón se puso a punto un método para visualizar el aumento de NAD(P)H en la mitocondria. Esta técnica es idónea para monitorizar el estado redox de la célula- β (Patterson *et al.*, 2000; Piston y Knobel, 1999a; Piston y Knobel, 1999b).

Para comprobar que esta señal de NAD(P)H que consideramos mitocondrial lo era,

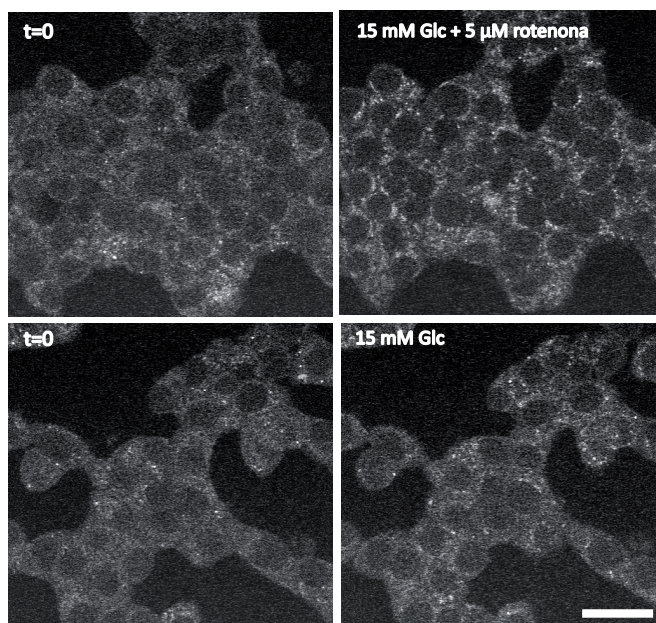


Figura 27. Autofluorescencia de NAD(P)H medida mediante microscopía multifotón en células Wt 24. Las células Wt 24 se preincubaron una hora en KRBH, 1,5 mM CaCl_2 a 37 °C. La fluorescencia inicial de las células revela sólo unos escasos puntos brillantes por célula, que corresponden a mitocondrias en foco. Las imágenes de NAD(P)H se tomaron inmediatamente antes ($t=0$) o tras la adición de 15 mM glucosa (Glc) + 5 μM rotenona (panel superior) ó 15 mM glucosa (panel inferior). La barra de escala representa 20 μm .

se estudió la respuesta a rotenona, que tiene efectos selectivos en el NAD(P)H mitocondrial, ya que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria. La adición de 5 μM rotenona (figura 27, panel superior) mostró claramente cómo se producía un gran aumento en la fluorescencia mitocondrial. La adición de 15 mM glucosa dio lugar a un aumento en la fluorescencia, con un patrón mitocondrial (figura 27, panel inferior), similar al anterior.

7.1. Generación de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa en ausencia de Ca^{2+} extracelular

Para estudiar el papel de aralar y de sus motivos que unen Ca^{2+} en la transferencia de poder redox del NAD(P)H inducida por glucosa a la mitocondria, se emplearon condiciones en las que se eliminaba el aumento de Ca^{2+} citosólico que la glucosa produce por la apertura de canales VDCC en la célula- β . Estas condiciones se consiguieron eliminando del medio extracelular el Ca^{2+} (medio libre de Ca^{2+}) y quelando el Ca^{2+} externo remanente con 100 μM EGTA al tiempo de la adición de la glucosa.

Con este abordaje experimental se eliminó de manera efectiva la entrada de Ca^{2+} causada por la glucosa, y no se observaron aumentos en el Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en ninguna de las líneas INS-1 analizadas (figura 28, A, B y C). Se han obtenido resultados similares tanto en líneas celulares INS-1, como en otras células- β (Rutter *et al.*, 1993). Como era de esperar, no se produjo ninguna entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en estas condiciones (figura 28 D, E y F). En estas condiciones, el porcentaje de células que mostraron aumentos en la generación de NAD(P)H mitocondrial en respuesta a una concentración estimulatoria de glucosa (15 mM) fue de sólo el 25 % respecto al total, mientras que aproximadamente el 70 % de esas células respondieron a glucosa en presencia de 1,5 mM Ca^{2+} extracelular (apartado 7.2, tabla 8). La fracción de células que responden en condiciones libres de Ca^{2+} fue similar en las líneas Wt 24, Mut 37, y aralar KD (tabla 7).

Tabla 7. Aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

Línea celular	15 mM Glucosa, 0 mM Ca^{2+}	
	Células respondedoras (%)	NAD(P)H mit [Respuesta máx (F/F_0) / basal (F/F_0)]
Aralar KD	21,55 \pm 2,36	1,375 \pm 0,02
Wt 24	25,71 \pm 5,82	1,358 \pm 0,19
Mut 37	29,54 \pm 7,92	1,438 \pm 0,03

El incremento en NAD(P)H mitocondrial (mit) inducido por glucosa se midió como el cambio en F/F_0 en células aralar KD, Wt 24 y Mut 37 incubadas en un medio libre de Ca^{2+} como se describe en la figura 12. La fracción de células que respondían a glucosa, y la elevación de la respuesta máxima F/F_0 sobre la respuesta basal F/F_0 se computó en las tres líneas celulares. Los datos son la media \pm SEM de 7-9 experimentos ($n = 200$ -250 células). F , fluorescencia; F_0 , fluorescencia inicial.

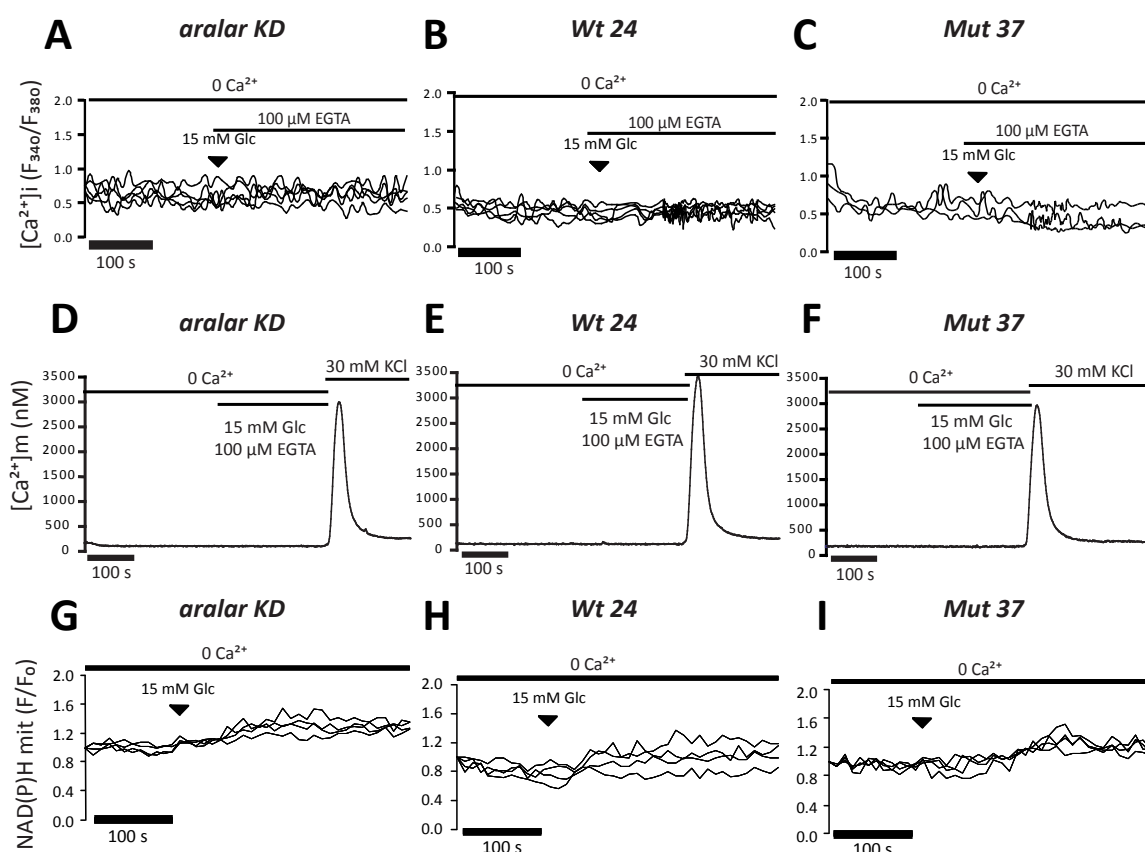


Figura 28. Respuesta de NAD(P)H inducida por glucosa en ausencia de Ca^{2+} extracelular en las líneas celulares aralar KD, Wt 24 y Mut 37. A-C. Medida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Células aralar KD, Wt 24, y Mut 37 previamente cargadas con la sonda Fura-2 AM se expusieron a glucosa (Glc) en KRBH libre de Ca^{2+} (en presencia de 100 μM EGTA) a 37 °C. Las adiciones individuales están indicadas con las flechas. Cada curva representa el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de una célula individual de un experimento representativo. D-F. Respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ inducida por glucosa (Glc) en células que expresan aequorina dirigida a la mitocondria de las líneas aralar KD, Wt 24, y Mut 37. Las células se expusieron a glucosa en presencia de KRBH libre de Ca^{2+} y 100 μM EGTA a 37 °C. Cada curva representa el $[\text{Ca}^{2+}]_m$ de toda la población celular de un experimento representativo. G-I. Generación de NAD(P)H mitocondrial en células aralar KD, Wt 24 y Mut 37. Las células aralar KD, Wt 24 y Mut 37 se preincubaron en KRBH sin glucosa y 1,5 mM Ca^{2+} durante 1 h a 37 °C y a continuación el medio se reemplazó con KRBH sin glucosa y sin Ca^{2+} (en presencia de 100 μM EGTA). Las adiciones de glucosa 15 mM (Glc) están indicadas con las flechas. Las curvas en G-I corresponden a cambios en la autofluorescencia normalizada (F/F_0) de NAD(P)H en la mitocondria en cuatro células individuales representativas.

Además, la respuesta máxima de la generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa fue también mucho más pequeña en un medio libre de Ca^{2+} que en un medio con Ca^{2+} (aproximadamente un aumento de $1,35 \pm 0,02$ veces en ausencia de Ca^{2+} frente a un aumento de $1,94 \pm 0,11$ veces en presencia de Ca^{2+} extracelular) (apartado 7.2, tabla 8) y además similar en las tres líneas celulares comparadas (figura 28 y tabla 7).

Estos resultados indican que en células INS-1 el incremento en la generación de NAD(P)H mitocondrial depende claramente de Ca^{2+} citosólico y/o mitocondrial. Debido a que este incremento no se redujo en la línea aralar KD, parece que MAS no se activa en estas condiciones, y que el incremento en la formación de NAD(P)H mitocondrial en un medio libre de Ca^{2+} , correspondía en su totalidad a la oxidación del piruvato en la mitocondria derivado de la glucosa.

7.2. Generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa en presencia de Ca^{2+} extracelular. Papel del Ca^{2+} citosólico y mitocondrial

Para estudiar la regulación por Ca^{2+} de la actividad MAS estimulada por glucosa en las células INS-1, se emplearon dos tipos de señales. Señales muy pequeñas y señales “grandes” de Ca^{2+} (similares a las fisiológicas). La señal muy pequeña de Ca^{2+} liberada al tiempo de la adición de glucosa, se obtuvo añadiendo glucosa (15 mM) junto con 250 μM ATP en presencia de 100 μM EGTA en KRBH libre de Ca^{2+} . Mediante la actuación sobre receptores purinérgicos, el ATP produce una liberación de Ca^{2+} (dependiente de inositol 1,4,5-trifosfato) del ER, que en ausencia de Ca^{2+} extracelular, resulta en una señal pequeña de Ca^{2+} (Li *et al.*, 1991; Rutter *et al.*, 1993). La estimulación de la generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa en estas condiciones se comparó con la obtenida en condiciones fisiológicas (señales “grandes” de Ca^{2+}), en las cuales, la adición de glucosa se hizo en un medio que contenía 1,5 mM Ca^{2+} .

La figura 29 muestra los cambios en Ca^{2+} citosólico (A-C) y mitocondrial (D-F), junto con el aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial (G-I) obtenidos cuando la glucosa se añadió en presencia de Ca^{2+} o en un medio libre de Ca^{2+} con ATP.

Más del 85 % de las células Wt 24 analizadas (185 células de cuatro experimentos independientes) respondieron a 15 mM glucosa en presencia de 1,5 mM Ca^{2+} extracelular, como se ha mostrado previamente en células cargadas con la sonda Fura-2, INS-1 (Rutter *et al.*, 1993) o células- β nativas (Theler *et al.*, 1992). Este aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por concentraciones estimulatorias (15 mM) de glucosa, tenía lugar en forma de espigas de Ca^{2+} más o menos sincrónicas y transitorias, en una fracción muy grande de células individuales Wt 24 (figura 29B), Mut 37 (figura 29C), y aralar KD (figura 29A) como se ha descrito previamente para células INS-1 (Kennedy *et al.*, 1996). Estas respuestas, medidas a nivel de célula individual, eran en su mayoría asincrónicas entre las diferentes células de cada experimento (ver las 3-4 curvas diferentes en la figura 29, A-C, que corresponden a células individuales).

La glucosa también produjo grandes aumentos en el Ca^{2+} mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$), a nivel de población celular, 4-7 veces mayores respecto al nivel basal de Ca^{2+} en la mitocondria (figura 29, D-F), como se ha mostrado previamente con vectores que codifican aequorina dirigida a la mitocondria en líneas celulares INS-1 (Kennedy *et al.*, 1996). Estos aumentos grandes en $[\text{Ca}^{2+}]_m$ fueron también esencialmente los mismos en las células Wt 24, Mut 37 y aralar KD.

Por el contrario, cuando las células INS-1 se expusieron a 15 mM glucosa junto con 250 μM ATP y 100 μM EGTA en KRBH libre de Ca^{2+} , el Ca^{2+} externo es quelado y por lo tanto se eliminó el influjo de Ca^{2+} inducido por glucosa, y la adición de ATP dio lugar a un

solo movimiento en forma de espiga de Ca^{2+} citosólico en células INS-1 (figura 29, A-C) (Rutter *et al.*, 1993).

En términos de Ca^{2+} mitocondrial, la respuesta fue notablemente mucho menor que la que se obtuvo en presencia de Ca^{2+} (figura 29, D-F), lo que indica que estas condiciones limitaban en gran medida la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. No se encontraron diferencias significativas en las respuestas máximas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o $[\text{Ca}^{2+}]_m$ obtenidas en estas condiciones cuando se compararon las líneas aralar KD (figura 29, A y D), Wt 24 (figura 29, B y E) y Mut 37 (figura 29, C y F).

La figura 29H muestra los considerables aumentos en la generación de NAD(P)H mitocondrial a los que dio lugar la glucosa en células individuales INS-1 Wt 24 en presencia de Ca^{2+} y en la condición libre de Ca^{2+} con ATP. De manera bastante sorprendente, las dos respuestas (tanto la respuesta máxima como el área debajo de la curva), eran prácticamente idénticas (figura 29H, Tabla 8), aunque las señales de Ca^{2+} citosólico y especialmente de Ca^{2+} mitocondrial, eran bastante más pequeñas en la condición libre de Ca^{2+} (figura 29, B y E). La comparación entre las figuras 29 G, y H, muestra que el *knock-down* de aralar resultó en un modesto descenso en la generación de NAD(P)H mitocondrial en respuesta a glucosa en presencia de Ca^{2+} , pero dio lugar a una disminución mayor en la generación de NAD(P)H mitocondrial, cuando se añadieron juntos glucosa y ATP con EGTA en un medio libre de Ca^{2+} . La tabla 8 muestra que la respuesta de NAD(P)H mitocondrial en la primera condición (en presencia de 1,5 mM Ca^{2+} , señales “grandes”) fue aproximadamente un 16 % (respuesta máxima) o un 30 % (área bajo la curva) menor que la que se observó en células Wt 24. La respuesta máxima en la condición libre de Ca^{2+} y con 250 μM ATP fue aproximadamente un 49 % (respuesta máxima) o un 60 % (área bajo la curva) menor que la que tuvo lugar en células Wt 24.

En su conjunto, estos resultados muestran claramente que la vía aralar-MAS aporta aproximadamente un 50 % a la generación total de NAD(P)H mitocondrial estimulado por glucosa cuando la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se encuentra fuertemente restringida. No obstante, este aporte fue sólo del 20 % cuando se generaron señales “grandes” de Ca^{2+} inducidas por glucosa en la mitocondria.

La figura 29I muestra que mutaciones en aralar que bloquean la unión a Ca^{2+} , mientras que mantienen su actividad transportadora, produjeron el mismo aumento en la formación de NAD(P)H mitocondrial en respuesta a glucosa en un medio que contenía Ca^{2+} , que el que tuvo lugar en la línea celular Wt 24 (tabla 8). No obstante, cuando se añadió la glucosa en la condición libre de Ca^{2+} , el aumento en el NAD(P)H mitocondrial se redujo notablemente, lo que representaba un descenso del 42 % (respuesta máxima o área bajo la curva) en relación

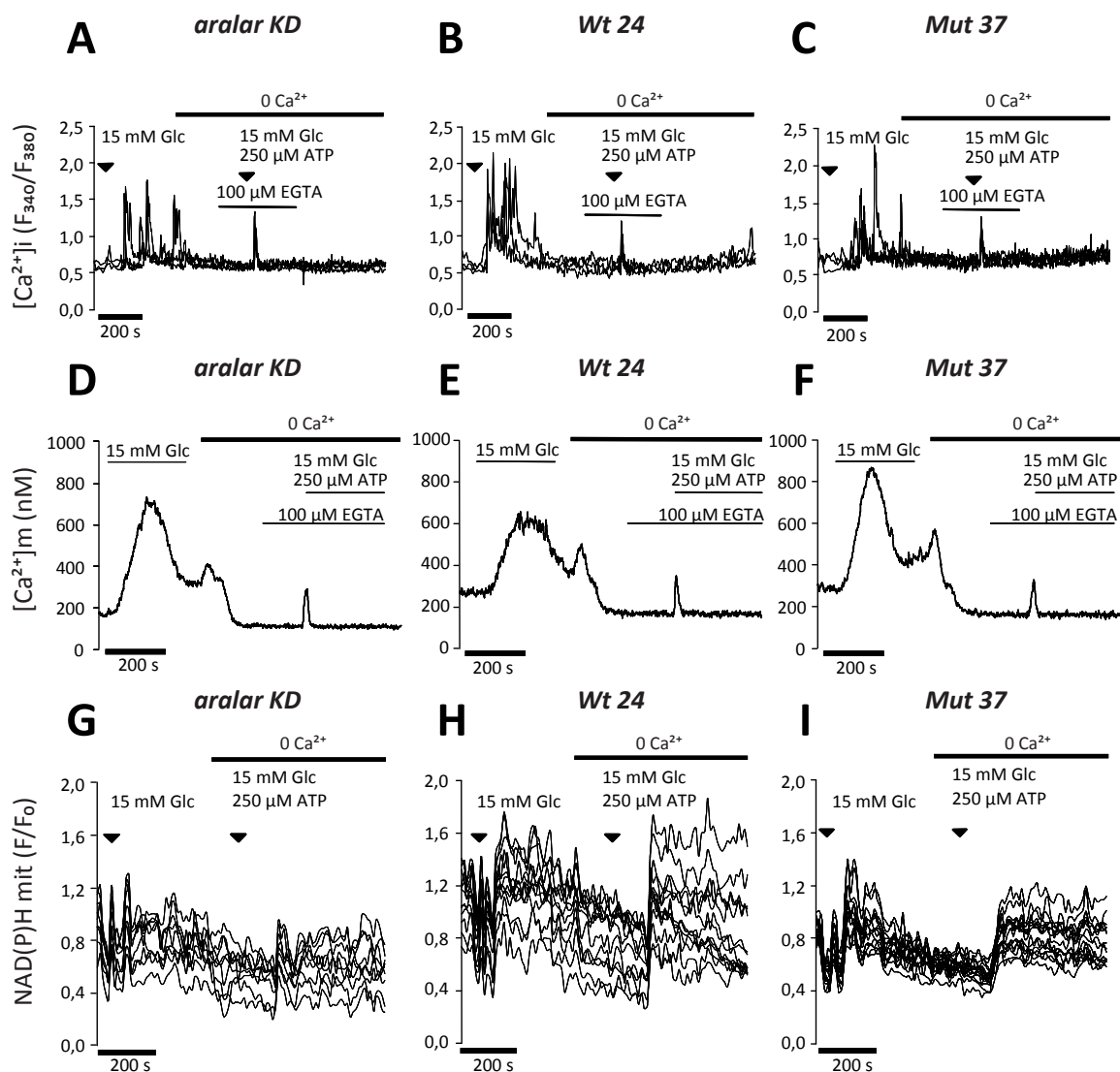


Figura 29. Efecto de las señales de Ca^{2+} en la respuesta de NAD(P)H inducida por glucosa en las líneas celulares *aralar KD*, *Wt 24* y *Mut 37*. A-C. Células *aralar KD*, *Wt 24*, y *Mut 37* previamente cargadas con la sonda Fura-2 AM se expusieron a glucosa (Glc) en presencia de 1,5mM Ca^{2+} , y tras un lavado, se expusieron a glucosa y ATP en presencia de KRBH libre de Ca^{2+} y 100 μM EGTA a 37 °C. Las adiciones individuales están indicadas con las flechas. Cada curva representa el $[Ca^{2+}]_i$ de una célula individual de un experimento representativo. D-F. Respuestas de $[Ca^{2+}]_m$ inducida por glucosa (Glc) en células que expresan aequorina dirigida a la mitocondria de las líneas *aralar KD*, *Wt 24*, y *Mut 37*. Las células se expusieron a glucosa en presencia de 1,5mM Ca^{2+} , y tras un lavado, se expusieron a glucosa y ATP en presencia de KRBH libre de Ca^{2+} y 100 μM EGTA a 37 °C. Cada curva representa el $[Ca^{2+}]_m$ de toda la población celular de un experimento representativo. G-I. Las células *aralar KD*, *Wt 24*, y *Mut 37* se preincubaron en KRBH sin glucosa y 1,5 mM Ca^{2+} durante 1 h a 37 °C y a continuación se expusieron dos veces a glucosa como se describe en A-C. El NAD(P)H mitocondrial se analizó mediante *imaging* de microscopía de 2-fotones. Las curvas en los paneles G-I corresponden a cambios en la autofluorescencia normalizada (F/F_0) del NAD(P)H en la mitocondria en células individuales respondedoras de un experimento representativo.

con las células *Wt 24* (tabla 8). La respuesta fue sólo ligeramente mayor que la que se obtuvo en las células *aralar KD* en las mismas condiciones.

Estos resultados muestran que la unión de Ca^{2+} a la extensión N-terminal de *aralar* es crítica en condiciones en las que la vía *aralar*-MAS juega un papel predominante en el aporte

de NAD(P)H a la mitocondria, es decir, cuando tiene lugar el aporte de glucosa y las señales de Ca^{2+} en el citosol son pequeñas y la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria está restringida. De hecho, el bloqueo de la unión a Ca^{2+} de estos motivos dio lugar a un bloqueo casi total de la vía aralar-MAS.

Tabla 8. Aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa en presencia de 1,5 mM Ca^{2+} o 250 μM ATP y 100 μM EGTA.

Línea celular	15 mM Glucosa, 1,5 mM Ca^{2+}			15 mM Glucosa, 250 μM ATP, 100 μM EGTA	
	Células respondedoras (%)	NAD(P)H mit [Respuesta máx (F/F_0) / basal (F/F_0)]	Área NAD(P)H mit	NAD(P)H mit [Respuesta máx (F/F_0) / basal (F/F_0)]	Área NAD(P)H mit
Aralar KD	33,62 \pm 5,95	1,784 \pm 0,11*	7,54 \pm 1,35***	1,575 \pm 0,07***	5,33 \pm 0,55***
Wt 24	70,12 \pm 6,12	1,941 \pm 0,07	11,344 \pm 0,89	2,118 \pm 0,09	14,19 \pm 1,06
Mut 37	70,28 \pm 12,58	1,922 \pm 0,07	9,38 \pm 0,68	1,667 \pm 0,05***	8,32 \pm 0,79***

El incremento en NAD(P)H mitocondrial (mit) inducido por glucosa se midió como el cambio en F/F_0 en células aralar KD, Wt 24 y Mut 37 incubadas en un medio que contenía 1,5 mM Ca^{2+} o 250 μM ATP en presencia de 100 μM EGTA como se describe en la figura 29. El análisis se restringió a las células respondedoras, es decir, a las células que presentaron respuesta estimuladora inducida por la adición de 15 mM glucosa en presencia de 1,5 mM Ca^{2+} . La respuesta máxima de F/F_0 sobre la respuesta basal F/F_0 se analizó en las dos condiciones y en las tres líneas celulares. También se analizó para cada célula respondedora el área bajo la región de respuesta máxima tras la adición de glucosa durante tres minutos (unidades arbitrarias). Los datos son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (n= 50-70 células). Se indican las diferencias significativas respecto a las células Wt 24 en cada condición del experimento (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *Mann-Whitney Test*). F , fluorescencia; F_0 , fluorescencia inicial.

En la figura 30 están representadas la respuesta máxima (figura 30A) y el área bajo la curva (figura 30B) en presencia de señales “grandes” (1,5 mM Ca^{2+}) y pequeñas de Ca^{2+} (medio libre de Ca^{2+} y 250 μM ATP), para las líneas aralar KD, Wt 24 y Mut 37.

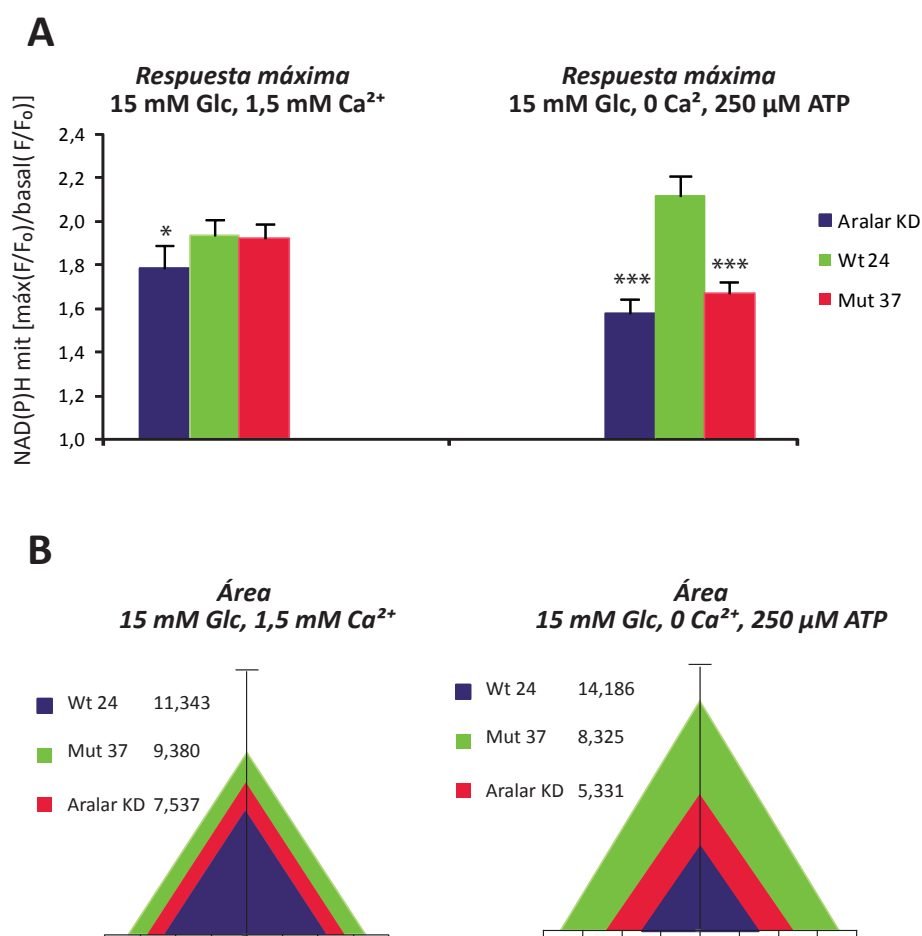


Figura 30. Representación de la respuesta máxima y el área bajo la curva del aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa en presencia de señales grandes y pequeñas de Ca^{2+} en células INS-1 aralar KD, Wt 24 y Mut 37. A. Respuesta máxima de NAD(P)H mitocondrial medida como (F/F₀) / basal (F/F₀) en presencia de señales “grandes” (1,5 mM Ca^{2+}) y señales pequeñas (250 μM ATP en presencia de KRBH libre de Ca^{2+} y 100 μM EGTA) de Ca^{2+} . Se indican las diferencias significativas respecto a las células Wt 24 en cada condición del experimento (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *Mann-Whitney Test*). B. Área bajo la región de respuesta máxima de NAD(P)H mitocondrial medida como (F/F₀) / basal (F/F₀) en presencia de señales “grandes” (1,5 mM Ca^{2+}) y señales pequeñas (250 μM ATP en presencia de KRBH libre de Ca^{2+} y 100 μM EGTA) de Ca^{2+} .

8. Oxidación de [U- ^{14}C]glucosa y [1- ^{14}C]piruvato en células Wt 24 y aralar KD

El piruvato derivado de la glucosa se metaboliza en la mitocondria, donde más del 90 % de los carbonos derivados de la glucosa son convertidos a CO_2 .

Con el fin de determinar una posible alteración en la oxidación de la glucosa y/o el piruvato, como consecuencia de una acumulación de NADH proveniente del flujo glicolítico en células INS-1 deficientes en aralar, se estudió la oxidación de ambos sustratos marcados con ^{14}C en células aralar KD y Wt 24.

La tasa de oxidación de [U- ^{14}C]glucosa (Rubi *et al.*, 2004) y [1- ^{14}C]piruvato (Ishihara *et al.*, 1999; Sener *et al.*, 1978) se cuantificó mediante la medida de la producción de $^{14}\text{CO}_2$

en células intactas durante un período de 2 horas de estimulación con 15 mM glucosa o 2 mM piruvato, respectivamente, en presencia de Ca^{2+} extracelular. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de producción de $^{14}\text{CO}_2$ entre ambas líneas para ninguno de los sustratos testados (figura 31). Estos resultados sugieren que la expresión de aralar no afecta al flujo glicolítico ni a la oxidación posterior dentro de la mitocondria del piruvato derivado de la glucosa.

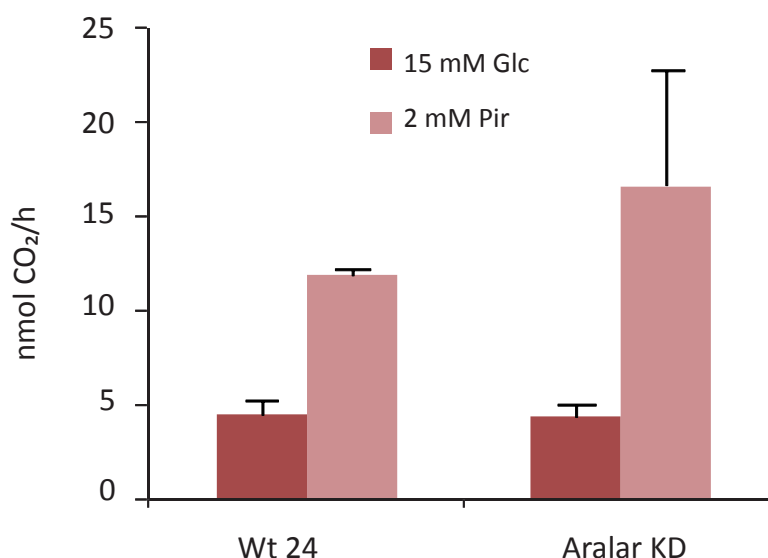


Figura 31. Oxidación de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[1-^{14}\text{C}]$ piruvato en células Wt 24 y aralar KD. Las células se incubaron durante 2 horas en tampón KRP que contenía 15 mM glucosa (Glc) o 2mM piruvato (Pir) en células Wt 24 y aralar KD, y se midió la oxidación de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[1-^{14}\text{C}]$ piruvato en la mitocondria, mediante la producción de $^{14}\text{CO}_2$. No se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares Wt 24 y aralar KD. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado para la glucosa o de 3 experimentos realizados por triplicado para el piruvato.

9. Papel de los motivos EF de aralar en la secreción de insulina inducida por glucosa

La mutación de los motivos EF de aralar en la línea Mut 37 bloquea la activación por Ca^{2+} de MAS sin afectar a su actividad basal (apartado 6.3. de Resultados) y no modifica la generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa en condiciones fisiológicas (1,5 mM Ca^{2+} , tabla 8). En estas condiciones fisiológicas la GSIS no se verá afectada, pero es posible que la activación por Ca^{2+} de aralar juegue algún papel en la potenciación que ejercen los agonistas que movilizan Ca^{2+} intracelular en GSIS. Para determinar el efecto que tenía la inactivación de los motivos que unen Ca^{2+} en aralar, se empleó el agonista UTP, que mediante su acción en los receptores purinérgicos (Santini *et al.*, 2009) provoca la movilización de Ca^{2+} intracelular, y se estudió su efecto sobre la secreción de insulina en

las líneas Wt 24 y Mut 37. Se analizó la secreción de insulina estimulada por 5,5 o 11 mM glucosa en presencia o ausencia de UTP (figura 32) en las líneas Wt 24 y Mut 37 durante un período de 75 minutos. Se observó una estimulación significativa causada por 100 μ M UTP en la secreción de insulina inducida por 5,5 mM glucosa en las células INS-1 Wt 24 ($7,31 \pm 0,48$ y $10,88 \pm 0,77$ ng/ml de insulina, a 5,5 mM Glc y 5,5 mM Glc + UTP, respectivamente; $p < 0,01$). Esta estimulación por UTP parece específica de concentraciones intermedias de glucosa, ya que no se observó a una concentración de 11 mM glucosa (figura 32).

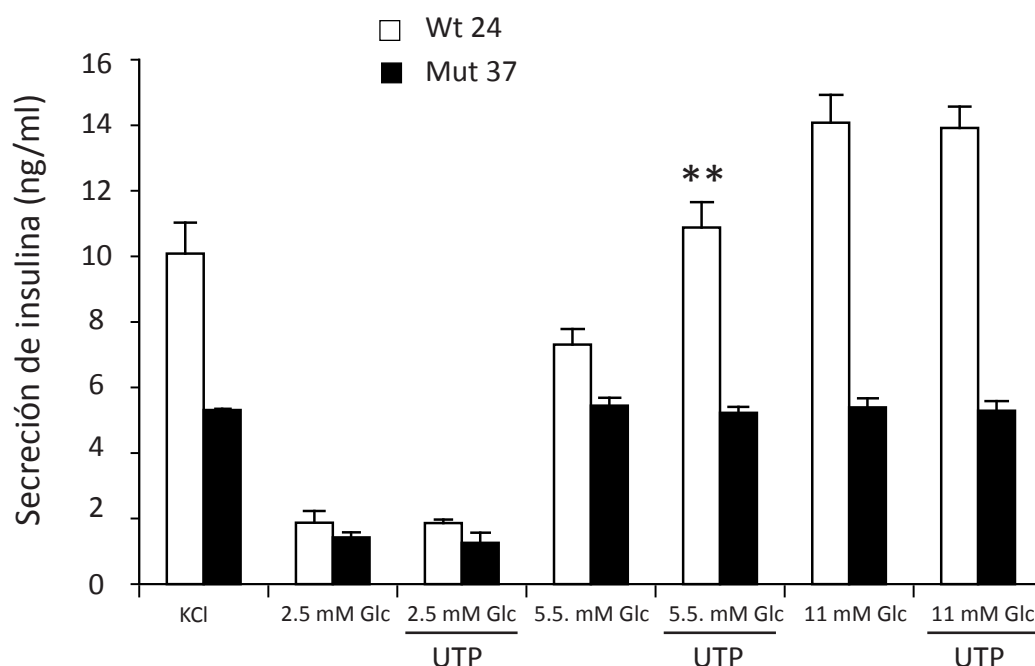


Figura 32. Secreción de insulina estimulada por UTP. Las células Wt 24 (barras blancas) y las células Mut 37 (barras negras) se cultivaron en placas de 24 pocillos y el experimento se realizó 48 horas después de la siembra. Las células se incubaron durante 75 minutos con 30 mM KCl (con 2,5 mM glucosa); y 2,5; 5,5 y 11 mM Glc en ausencia o presencia de 100 μ M UTP. Los datos representan la media \pm SEM de 4 medidas independientes para cada línea celular. Se indica la diferencia significativa respecto a la misma concentración de glucosa en ausencia de UTP (**, $p < 0,01$, *unpaired t-test*).

En la línea Mut 37, no se apreció un aumento inducido por UTP en la secreción de insulina a ninguna de las concentraciones de glucosa empleadas, lo que, en principio, indicaría la implicación de la unión de Ca^{2+} a aralar en el proceso. No obstante, también existían alteraciones en la secreción de insulina en respuesta a 11 mM glucosa y a KCl. El KCl despolariza la membrana plasmática de manera independiente al metabolismo mitocondrial. En el caso de las células Wt 24, la secreción de insulina en respuesta a KCl y 11 mM glucosa representó 5,4 y 7,5 veces la basal, respectivamente ($10,09 \pm 0,94$ y $14,08 \pm 0,85$ ng/ml de insulina secretada para KCl y 11 mM glucosa, respectivamente). En el caso de Mut 37, la secreción de insulina en respuesta a KCl era sólo de 3,74 veces y la que se produjo en respuesta a glucosa 11 mM fue de 3,79 veces respecto a la secreción basal ($5,31 \pm 0,04$ y

$5,39 \pm 0,28$ ng/ml de insulina secretada para KCl y glucosa 11 mM, respectivamente). Estos datos coincidían con datos de experimentos previos en los que la línea Mut 37 secretó 4,4 y 3,8 veces más insulina para KCl y glucosa 15 mM, respectivamente, respecto a la secreción basal a 2,5 mM glucosa ($9,30 \pm 0,82$ y $8,15 \pm 2,4$ ng/ml de insulina secretada para KCl y glucosa 15 mM, respectivamente).

Esta reducción en la secreción de insulina en la línea Mut 37 respecto a la línea Wt 24 a altas concentraciones de glucosa, y principalmente, a KCl, hace que no podamos llegar a una interpretación concluyente de los resultados.

Efecto de la pérdida de una dosis de Aralar como factor de riesgo para la diabetes tipo 2

10. Efecto de la dieta grasa en ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}

La expresión de aralar en el páncreas entero está restringida al páncreas endocrino, y en concreto, a las células- β (Rubi *et al.*, 2004). Su carencia podría afectar a la función pancreática y a la homeostasis de la glucosa a nivel de organismo entero, y nuestra hipótesis de trabajo es que podría dar lugar al desarrollo de diabetes tipo 2 (T2D). Los ratones *Aralar*^{-/-} mueren prematuramente, aproximadamente en el día 20 postnatal (Jalil *et al.*, 2005). Esto hace que no sea posible una comparación con los ratones *wild-type*. Por esto, se optó por estudiar la carencia de *Aralar* en ratones hemizigotos. Aunque los ratones *Aralar*^{+/-} en situación basal no manifiestan alteraciones evidentes en la homeostasis de la glucosa (como se verá mas adelante), podrían ser más susceptibles a desarrollar diabetes tipo 2 cuando se exponen continuamente a una dieta rica en grasas, como ocurre en varios modelos animales (Hwang *et al.*, 2009; Saberi *et al.*, 2009; Shiota *et al.*, 2001).

Previamente se comprobó que existe un efecto de dosis génica que correlaciona con la cantidad de proteína aralar en diferentes tejidos que expresan de manera mayoritaria esta isoforma frente a la isoforma citrina/aralar2 (Del Arco *et al.*, 2000; del Arco y Satrustegui, 1998). Los niveles de proteína aralar en ratones hemizigotos son aproximadamente la mitad que en los *wild-type* (Jalil *et al.*, 2005).

También se comprobó que no existían diferencias en los niveles basales de glucosa (en torno a 160 mg/dl y 170mg/dl, en hembras y machos, respectivamente) tras una noche de ayuno, ni en los niveles basales de insulina (tras una noche de ayuno) a los 6 meses, edad en la que comenzó el tratamiento (tablas 9 y 10).

Tabla 9. Parámetros iniciales en ratones hembras de 6 meses de edad

	<i>Aralar</i> ^{+/+}	<i>Aralar</i> ^{+/-}
<i>Peso corporal (g)</i>	24,71 \pm 0,79	24,45 \pm 0,70
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	158,7 \pm 6,63	157,95 \pm 6,64
<i>Insulina (ng/ml)</i>	0,342 \pm 0,089	0,326 \pm 0,071

Tabla 10. Parámetros iniciales en ratones machos de 6 meses de edad

	<i>Aralar</i> ^{+/+}	<i>Aralar</i> ^{+/-}
<i>Peso corporal (g)</i>	38,86 \pm 2,28	37,93 \pm 2,01
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	169,05 \pm 9,375	183,9 \pm 11,993
<i>Insulina (ng/ml)</i>	0,413 \pm 0,056	0,410 \pm 0,105

Además, se determinó la ingesta *ad libitum* (figura 33) durante 2 semanas en hembras (figura 33A) y machos (figura 33B) de 6 meses de edad en los genotipos *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} con pienso estándar, y no se encontraron diferencias significativas entre diferentes genotipos del mismo sexo; siendo ésta siempre mayor en los machos. Además, las tablas 9 y 10 muestran como los pesos de los machos eran bastante mayores que los de las hembras, a los 6 meses de edad, independientemente del genotipo.

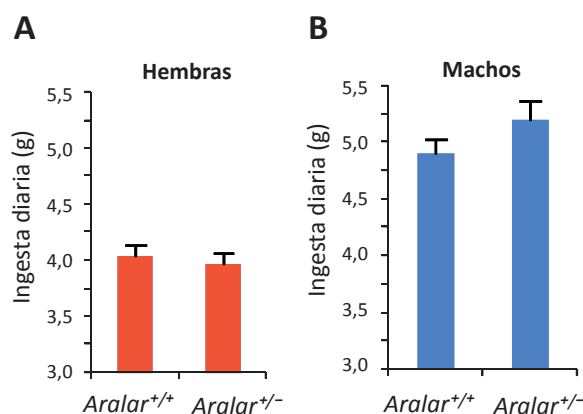


Figura 33. Ingesta de comida diaria. Comparación de la ingesta diaria durante 14 días entre los ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} hembras (A) y machos (B). Los datos mostrados son la media ± SEM (n=6-9 ratones de cada sexo y genotipo). No se encontraron diferencias significativas para distintos genotipos del mismo género.

Para estudiar si la mitad de dosis génica de *Aralar* es un factor de riesgo en el desarrollo de T2D promovida por una dieta grasa, los ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} de fondo mixto C57BL/6xSv129 de ambos sexos se alimentaron durante 50 semanas con una dieta rica en grasas y se compararon con los respectivos grupos control de ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} alimentados en paralelo con una dieta baja en grasas (dietas HF y control, respectivamente; descritas en el apartado 14.4.1. de materiales y métodos). En la figura 34

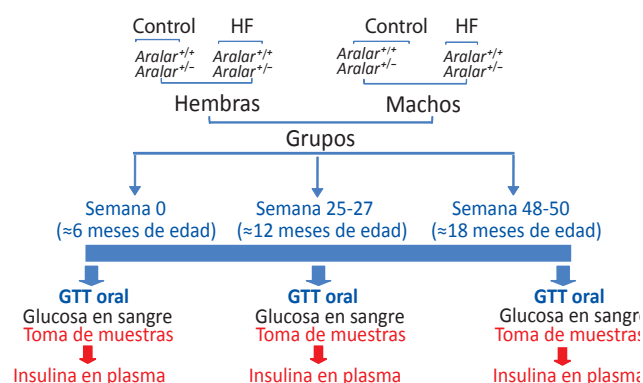


Figura 34. Desarrollo del experimento de dieta grasa (HF) en ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}. Se generaron 8 grupos experimentales de ambos sexos y genotipos y se alimentaron con dieta control (Control) o grasa (HF) durante 50 semanas. En los tiempos indicados, se hicieron tests de tolerancia a glucosa (GTT), se determinaron los niveles de glucosa en sangre y se recogieron muestras de sangre para su posterior análisis y determinación de insulina en plasma.

está representado un esquema del desarrollo del experimento de dieta HF.

Se generaron 8 grupos experimentales, compuesto cada uno por 8-10 ratones de aproximadamente 6 meses de edad, hembras *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} (dieta control y dieta HF) y machos *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} (dieta control y dieta HF); para poder comparar entre tratamiento y genotipo y en ambos sexos; y se mantuvieron en observación durante las 50 semanas del experimento. Se analizaron su tolerancia a glucosa y niveles plasmáticos de insulina mediante un test oral de tolerancia a glucosa (GTT) a los 12 y a los 18 meses de edad.

Como los resultados obtenidos en hembras y machos son muy diferentes, los trataremos separadamente.

10.1. Efecto en la ganancia de peso

Se hizo un seguimiento semanal del peso de cada ratón durante todo el experimento. Ya durante las primeras semanas del experimento, el peso corporal en los ratones alimentados con HF es significativamente más alto que los alimentados con dieta control

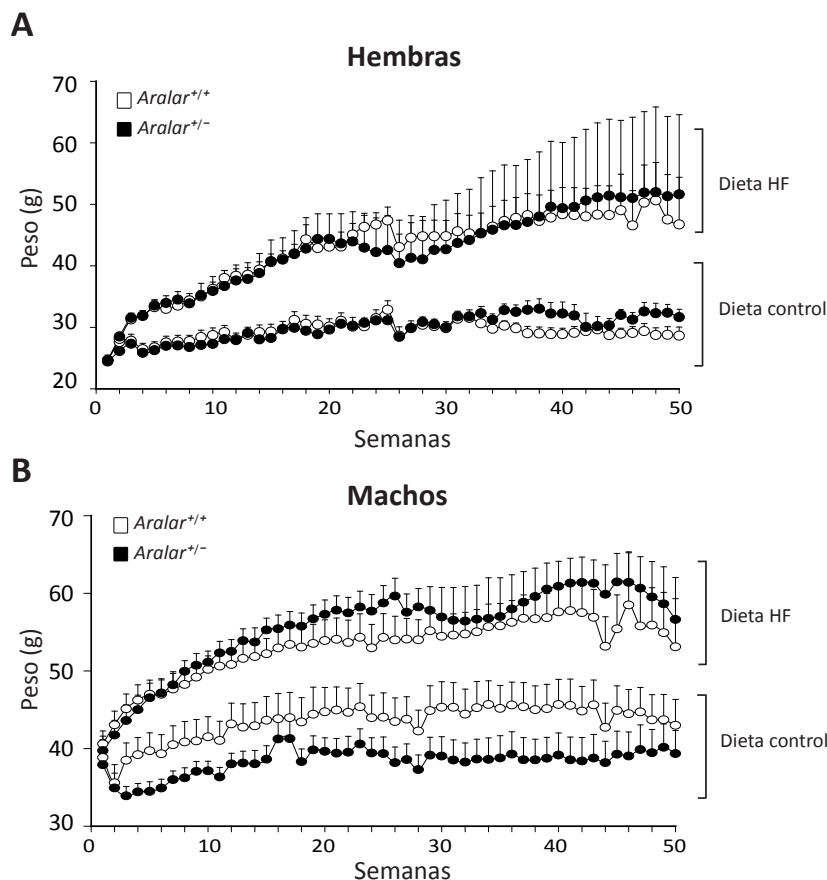


Figura 35. Pesos en ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}. Cada ratón se pesó semanalmente durante el transcurso del experimento. Pesos de ratones *Aralar*^{+/+} (\circ) alimentados con dieta control o dieta HF, y *Aralar*^{+/-} (\bullet) alimentados con dieta control o dieta HF, en hembras (A) y machos (B). Los datos representan la media \pm SEM.

independientemente de su dosis génica de *Aralar*, tanto en hembras (figura 35A, $p<0,05$), como en machos (figura 35B, $p<0,05$).

Curiosamente, el único efecto del genotipo se observó en el grupo de animales alimentados con dieta control, y sólo en los machos; los machos *Aralar*^{+/-}, mantuvieron un peso algo más bajo que los *Aralar*^{+/+} (figura 35B).

10.2. Efecto en la tolerancia a glucosa y en la secreción de insulina

Los tests de tolerancia a glucosa se llevaron a cabo antes de administrar a los ratones dieta HF o dieta control (ratones de 6 meses de edad; figuras 36 y 38, para hembras y machos, respectivamente), y posteriormente, en las semanas 25-27 y 48-50 (ratones de 12 y 18 meses de edad; figuras 37 y 39, para hembras y machos, respectivamente).

Las hembras, al inicio del experimento (ratones de 6 meses de edad) presentaban en el GTT una reversión de los valores de glucosa en sangre al cabo de los 120 min (figura 36A). Esta reversión se acompañaba de un aumento en los niveles plasmáticos de insulina, que también retornaban hacia los niveles iniciales a los 120 min (figura 36B). Este efecto fue el mismo en los dos genotipos.

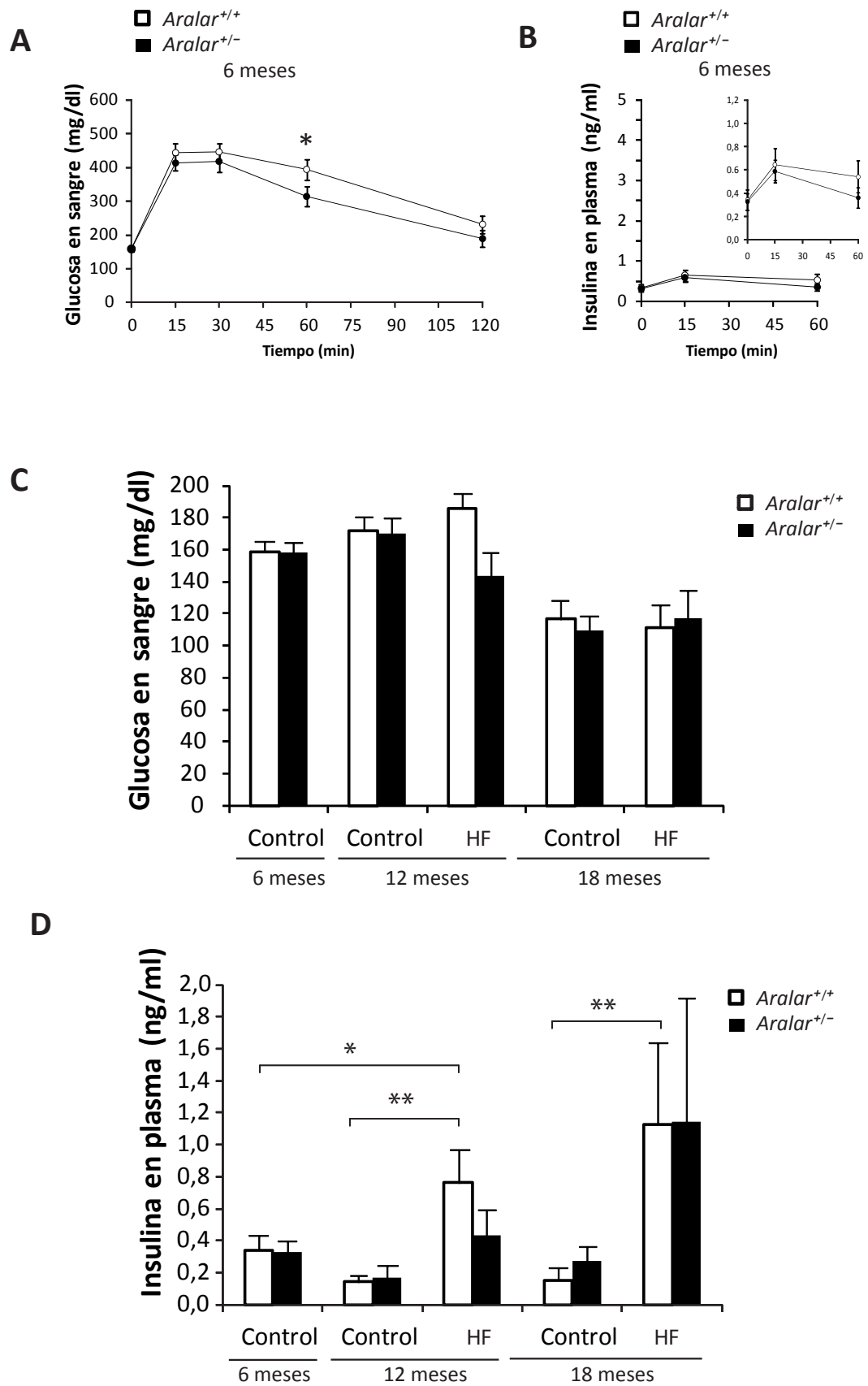
En hembras de 12 meses de edad, la glucemia y los niveles de insulina (tras un ayuno de 12 horas) eran iguales en los dos genotipos que se alimentaron con dieta control (figura 36, C y D). En las hembras sometidas a dieta HF existía una tendencia hacia el aumento en los niveles de glucosa, que ocurría en las hembras *Aralar*^{+/+}, pero no en las *Aralar*^{+/-} (figura 36, C y D); así como un aumento en sus niveles de insulina en los dos genotipos (figura 36D).

A los 18 meses de edad, la glucemia era igual en todas las hembras (figura 36C), pero los ratones alimentados con dieta HF *Aralar*^{+/+} desarrollaron una marcada hiperinsulinemia. Es decir, la hiperinsulinemia que suele desarrollarse como consecuencia de una dieta HF parece hacerlo más acusadamente en los ratones *wild-type*, mientras que en los *Aralar*^{+/-} no alcanza valores significativos.

Figura 36. Test de tolerancia a glucosa (al inicio del experimento) y niveles de glucosa e insulina en ratones hembras *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}.

Test de tolerancia a glucosa en ratones de 6 meses de edad tras un ayuno durante la noche (A, B). A. Valores de glucosa en sangre en el minuto 0 (glucosa basal), y tras administrarles 150 mg de D-glucosa mediante una sonda oral, a los 15, 30, 60 y 120 minutos en ratones *Aralar*^{+/+} (○) y *Aralar*^{+/-} (●). Se indican las diferencias significativas entre diferentes genotipos (*, $p<0,05$; Mann-Whitney Test). B. Valores de insulina en plasma en el minuto 0 (glucosa basal), y tras administrarles 150 mg de D-glucosa, a los 15 y 60 minutos en ratones *Aralar*^{+/+} (○) y *Aralar*^{+/-} (●). El inserto que aparece en la esquina superior derecha representa la misma gráfica del panel (Insulina en plasma (ng/ml) respecto al tiempo) en una escala diferente. Los datos representan la media \pm SEM de 5-10 ratones de cada genotipo y dieta. Niveles de glucosa basal en sangre (C) o insulina en plasma (D) de ratones de 6 meses de edad (inicio del experimento), de 12 meses de edad (tras 6 meses de dieta control o dieta HF) y de 18 meses de edad (tras 12 meses de dieta control o dieta HF). Los datos representan la media \pm SEM de 5-10 ratones de cada genotipo y dieta. Se indican las diferencias significativas (*, $p<0,05$; ** $p<0,01$; unpaired t-test o Mann-Whitney Test).

Hembras



Tras 25-27 semanas (ratones de 12 meses de edad), las hembras dejaron de retirar la glucosa en el GTT, apareciendo por primera vez en las hembras tanto *Aralar*^{+/+} como *Aralar*^{+/-} el fenómeno de intolerancia a la glucosa, tanto en las alimentadas con dieta control como dieta HF y era más acentuada en los animales *wild-type* que se alimentaron con dieta HF (figura 37, A y C).

Sin embargo, se produjo un fuerte aumento en los niveles de insulina tras la administración de glucosa en todos los animales, sobre todo en los animales que se alimentaron con dieta HF (figura 37, B y D).

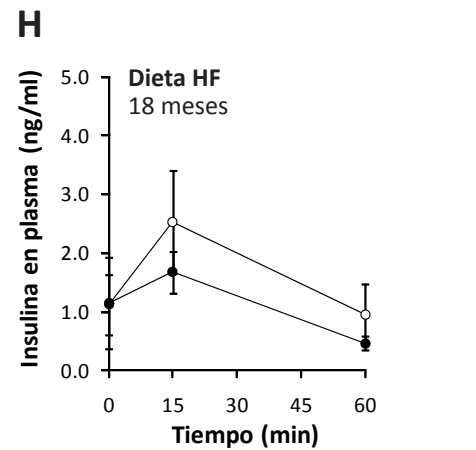
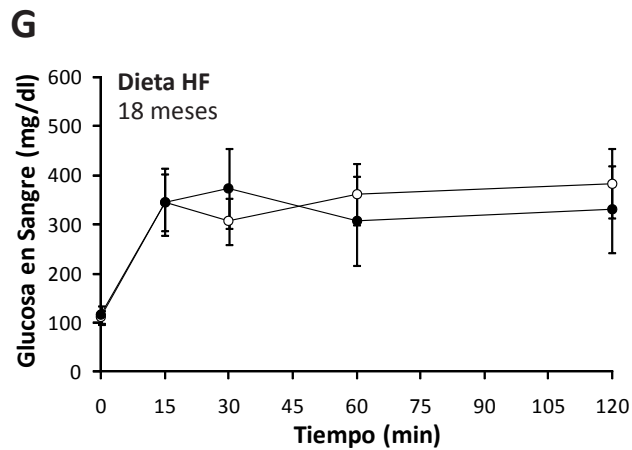
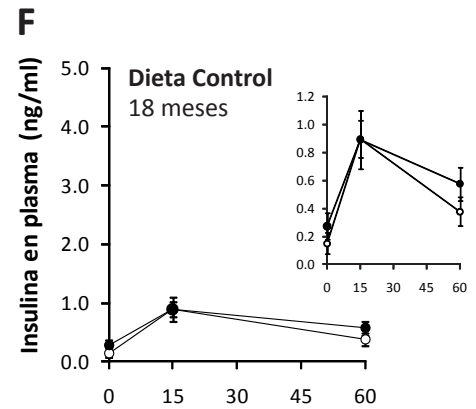
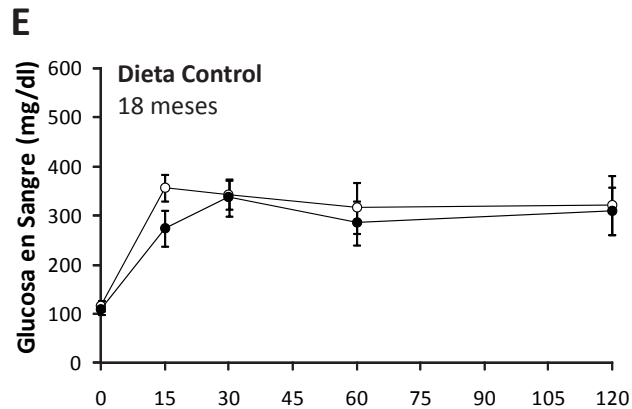
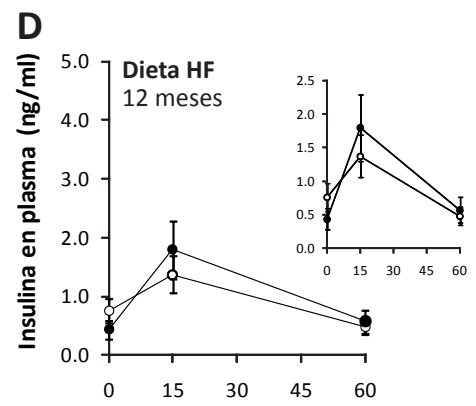
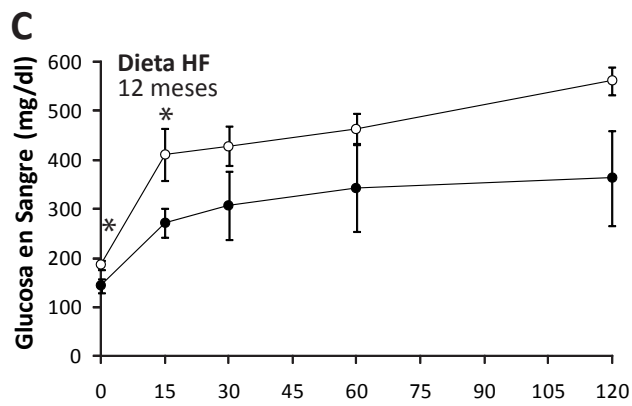
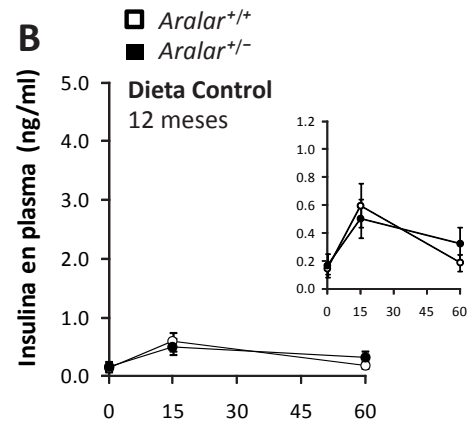
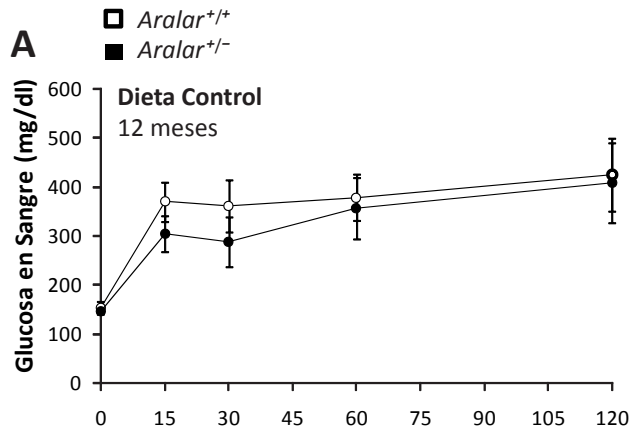
Tras 48-50 semanas (ratones de 18 meses de edad), siguió sin apreciarse ningún signo de diabetes en los ratones sometidos a dieta HF. Se mantuvo la misma intolerancia a la glucosa en las hembras de los dos genotipos y de las dos dietas (figura 37, E y G), así como los mismos niveles de insulina en respuesta a glucosa en los ratones de dieta control. Sin embargo, en los ratones alimentados con dieta HF, el aumento en los niveles de insulina inducido por glucosa era más pequeño en los *Aralar*^{+/-} que en los *wild-type* (figura 37, F y H).

El área bajo la curva (hallada según se detalla en el apartado 14.4.3 de Materiales y Métodos) para hembras de 18 meses de edad que se alimentaron con dieta HF era $62,69 \pm 22,65$ en *Aralar*^{+/+} y $36,09 \pm 7,08$ en *Aralar*^{+/-}. Esta diferencia es posiblemente mayor, ya que este último valor está sobrestimado porque se eliminaron 3 ratones en los cuales el pico de insulina no fue detectable.

Esto no puede deberse a un fallo en la secreción de la insulina en los ratones hemizigotos, sino más bien a una menor resistencia a la acción de la insulina, como se comentará mas adelante.

Figura 37. Medida de los niveles de glucosa e insulina en el test de tolerancia a glucosa (GTT) en hembras *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}. Se administraron 2 mg/g de D-glucosa a los ratones *Aralar*^{+/+} (○) y *Aralar*^{+/-} (●) alimentados con dieta control o HF tras un ayuno durante la noche. La glucosa en sangre e insulina en plasma se determinaron a partir de muestras de sangre obtenidas de la mejilla del ratón. A y B. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 12 meses de edad alimentados con dieta control; C y D. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 12 meses de edad alimentados con dieta HF; E y F. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 18 meses de edad alimentados con dieta control; G y H. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 18 meses de edad alimentados con dieta HF. Los insertos que aparecen en la esquina superior derecha representan la misma gráfica del panel (Insulina en plasma (ng/ml) respecto al tiempo) en una escala diferente. Los datos representan la media \pm SEM de 5-10 ratones de cada genotipo y dieta. Se indican las diferencias significativas entre diferentes genotipos (*, $p < 0,05$; *unpaired t-test*).

Hembras



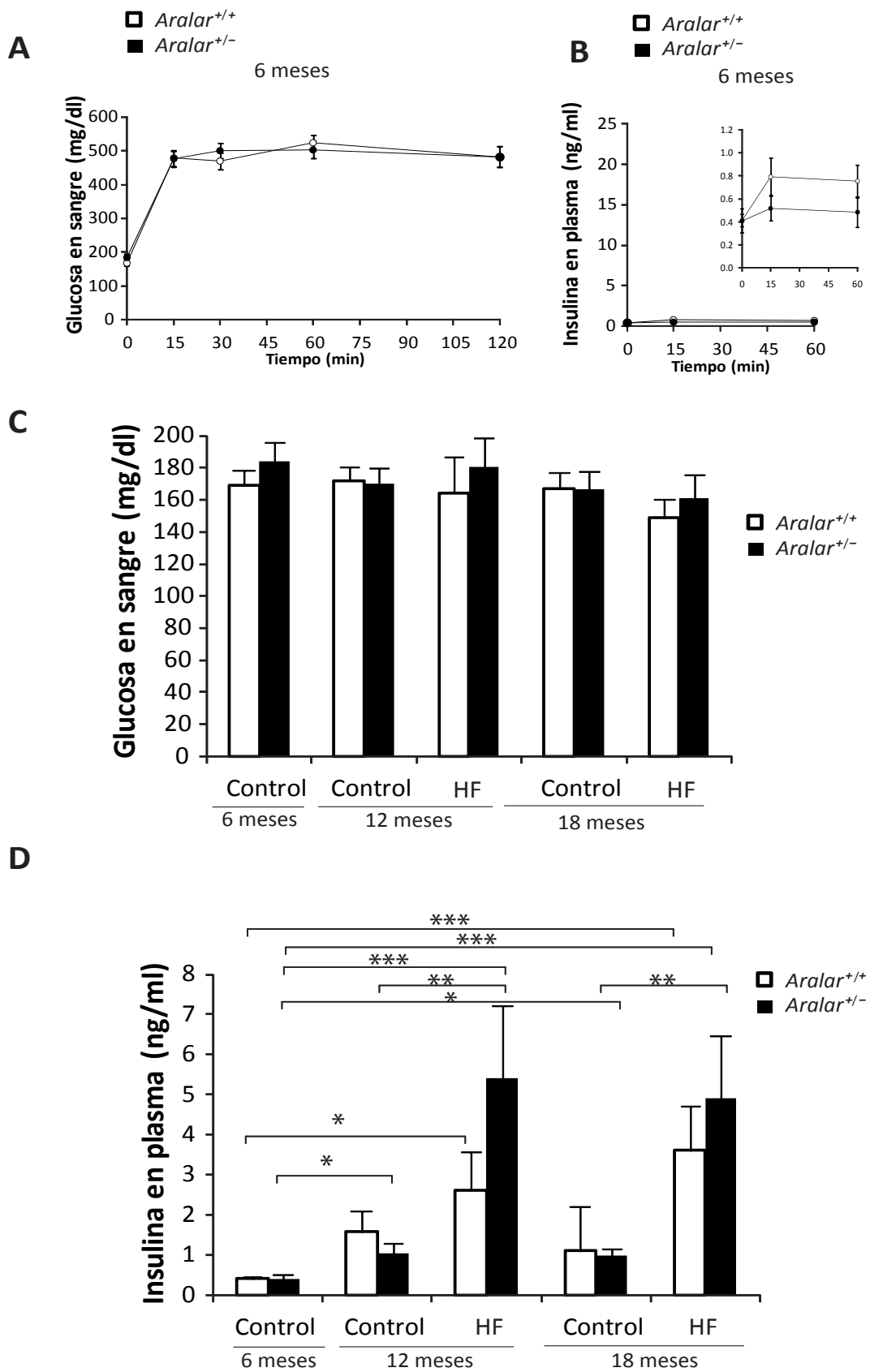
Los ratones machos de ambos genotipos desde el inicio del experimento (a los 6 meses de edad) manifestaron intolerancia a glucosa en el GTT (figura 38A). No obstante, eran capaces de secretar insulina en respuesta a glucosa (figura 38B).

En los machos, a los 12 meses y 18 meses de edad, la glucemia tras un ayuno de 12 horas era similar en los dos genotipos, tanto en los que se habían alimentado con dieta control como en los que lo hicieron con dieta HF (figura 38 C). En estos ratones, desde los 12 meses (figura 38D) se manifestó una hiperinsulinemia equivalente y/o mayor que la que se produjo en hembras alimentadas con dieta HF de 18 meses de edad (figura 36D). Además, esta hiperinsulinemia se exacerbó con la dieta HF, especialmente en los machos hemizigotos (en estos ratones la insulina basal era 1,02 y 5,40 ng/ml en dieta control y HF, respectivamente a los 12 meses y 0,99 o 4,91 ng/ml en dieta control y HF, respectivamente a los 18 meses; figura 38 D).

Figura 38. Test de tolerancia a glucosa (al inicio del experimento) y niveles de glucosa e insulina en ratones machos *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}.

Test de tolerancia a glucosa en ratones de 6 meses de edad tras un ayuno durante la noche (A, B). A. Valores de glucosa en sangre en el minuto 0 (glucosa basal), y tras administrarles 150 mg de D-glucosa mediante una sonda oral, a los 15, 30, 60 y 120 minutos en ratones *Aralar*^{+/+} (○) y *Aralar*^{+/-} (●). Se indican las diferencias significativas entre diferentes genotipos (*, $p < 0,05$; *Mann-Whitney Test*). B. Valores de insulina en plasma en el minuto 0 (glucosa basal), y tras administrarles 150 mg de D-glucosa, a los 15 y 60 minutos en ratones *Aralar*^{+/+} (○) y *Aralar*^{+/-} (●). El inserto que aparece en la esquina superior derecha representa la misma gráfica del panel (Insulina en plasma (ng/ml) respecto al tiempo) en una escala diferente. Los datos representan la media \pm SEM de 5-10 ratones de cada genotipo y dieta. Niveles de glucosa basal en sangre (C) o insulina en plasma (D) de ratones de 6 meses de edad (inicio del experimento), de 12 meses de edad (tras 6 meses de dieta control o dieta HF) y de 18 meses de edad (tras 12 meses de dieta control o dieta HF). Los datos representan la media \pm SEM de 5-10 ratones de cada genotipo y dieta. Se indican las diferencias significativas (*, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *unpaired t-test* o *Mann-Whitney Test*).

Machos



Durante el transcurso del experimento, la intolerancia a la glucosa se mantuvo en ambos genotipos y en ambas dietas (figura 39 A, C, E y G). Sin embargo, en los machos de dieta control (figura 39, A y E) estos niveles de glucosa durante el GTT se mantuvieron a expensas de un menor aumento (aunque no significativo) de los niveles plasmáticos de insulina tanto a los 12 como a los 18 meses (comparar figura 39, B y F), al igual que ocurría en las hembras hemizigotas alimentadas con dieta HF.

Como ya se indicó en el caso de las hembras, puesto que estos animales siguen siendo euglicémicos, este comportamiento no puede deberse a ningún fallo en la secreción de la insulina, sino probablemente a una menor resistencia a la misma en los ratones hemizigotos.

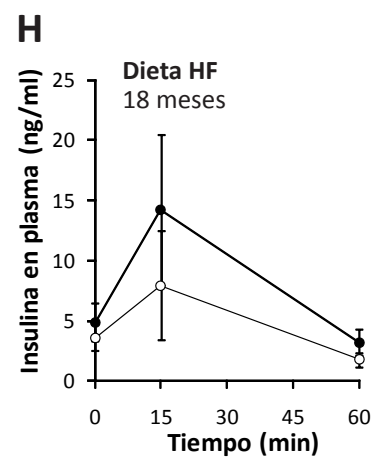
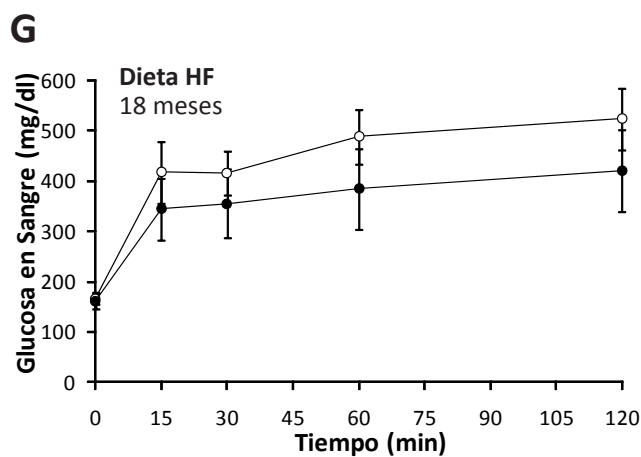
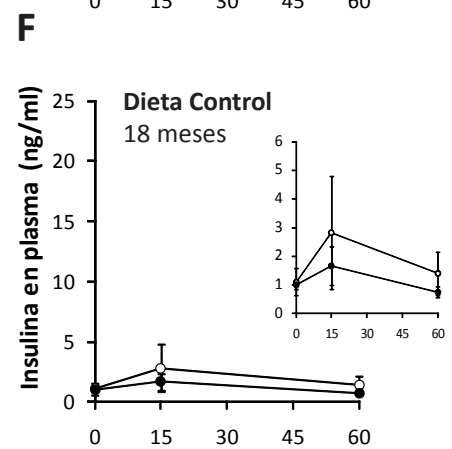
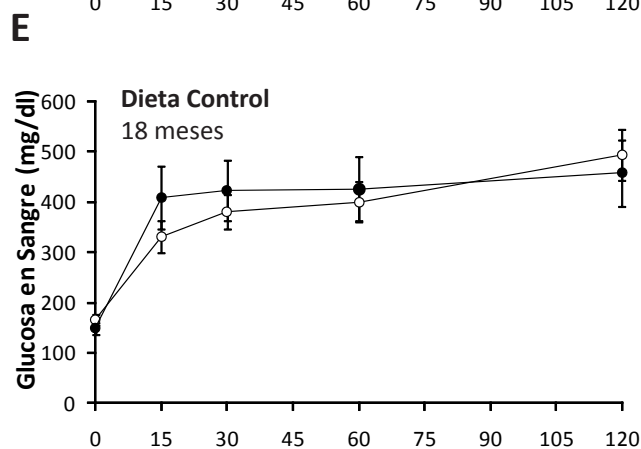
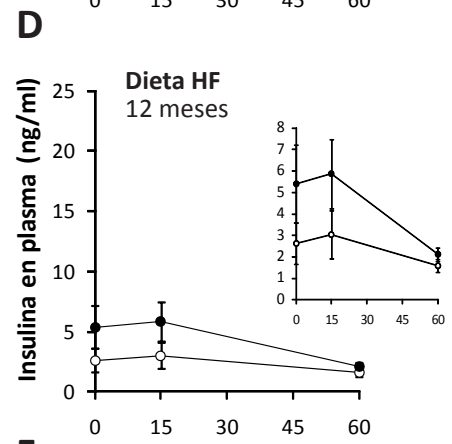
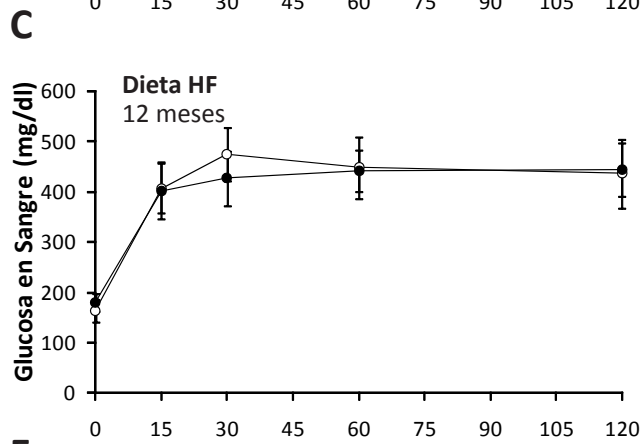
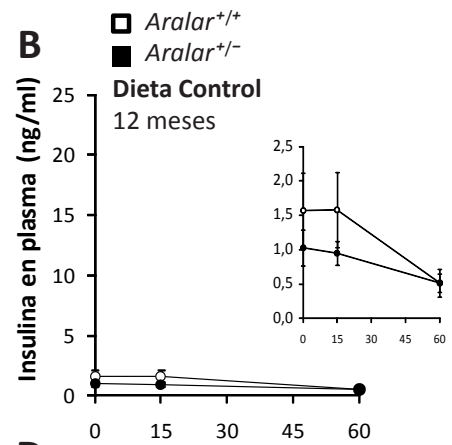
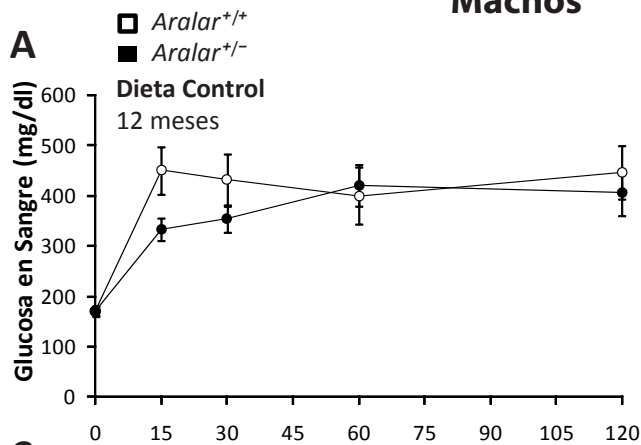
Curiosamente, en los machos de dieta HF el mantenimiento de la glucemia durante GTT se produjo a expensas de una estimulación de la secreción de insulina promovida por glucosa aparentemente mayor en los hemizigotos que en los *wild-type* (figura 39, D y H).

Por tanto, en su conjunto, en los machos y hembras *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} la edad y/o la dieta HF resultó en una hipersecreción de insulina, pero los ratones no desarrollaron una diabetes franca, es decir, mantuvieron la capacidad del páncreas para la secreción de la insulina. Tampoco desarrollaron hiperglucemia basal, otro criterio utilizado en algunos casos para definir el estado diabético (Oh *et al.*, 2008). Conviene señalar que ratones *wild-type* de varias edades sometidos a periodos de dieta HF de diferente duración, tampoco desarrollaban T2D (resultados no publicados, consorcio EuroDia, 2009).

La hipótesis inicial postulando la falta de una dosis de *Aralar* como un factor de riesgo para el desarrollo de T2D se descarta ante los resultados obtenidos.

Figura 39. Medida de los niveles de glucosa e insulina en el test de tolerancia a glucosa (GTT) en machos *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}. Se administraron 2 mg/g de D-glucosa a los ratones *Aralar*^{+/+} (○) y *Aralar*^{+/-} (●) alimentados con dieta control o HF tras un ayuno durante la noche. La glucosa en sangre e insulina en plasma se determinaron a partir de muestras de sangre obtenidas de la mejilla del ratón. A y B. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 12 meses de edad alimentados con dieta control; C y D. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 12 meses de edad alimentados con dieta HF; E y F. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 18 meses de edad alimentados con dieta control; G y H. Niveles de glucosa e insulina en ratones de 18 meses de edad alimentados con dieta HF. Los insertos que aparecen en la esquina superior derecha representan la misma gráfica del panel (Insulina en plasma (ng/ml) respecto al tiempo) en una escala diferente. Los datos representan la media ± SEM de 5-10 ratones de cada genotipo y dieta.

Machos



11. Supervivencia de ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}

Los ratones *Aralar*^{-/-} tienen una vida media corta de aproximadamente 20 días y defectos en el desarrollo (Jalil *et al.*, 2005). Sin embargo, los ratones *Aralar*^{+/-}, con sólo una dosis génica, sí son capaces de llegar al estado adulto. En estudios anteriores (Laura Contreras, Tesis Doctoral, 2007) se encontró una tendencia a mayor longevidad en ratones machos y hembras *Aralar*^{+/-} respecto a los *Aralar*^{+/+}. Con el fin de estudiar la vida media entre los ratones *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-}, se compararon 4 grupos de ratones, tanto hembras (*Aralar*^{+/+}, *Aralar*^{+/-}), como machos (*Aralar*^{+/+}, *Aralar*^{+/-}) y se analizó la longevidad de los ratones de cada uno de los grupos (figura 40). Existe una tendencia (no significativa) a una longevidad mayor en ratones machos *Aralar*^{+/-} respecto a los *Aralar*^{+/+} (figura 40B) que no

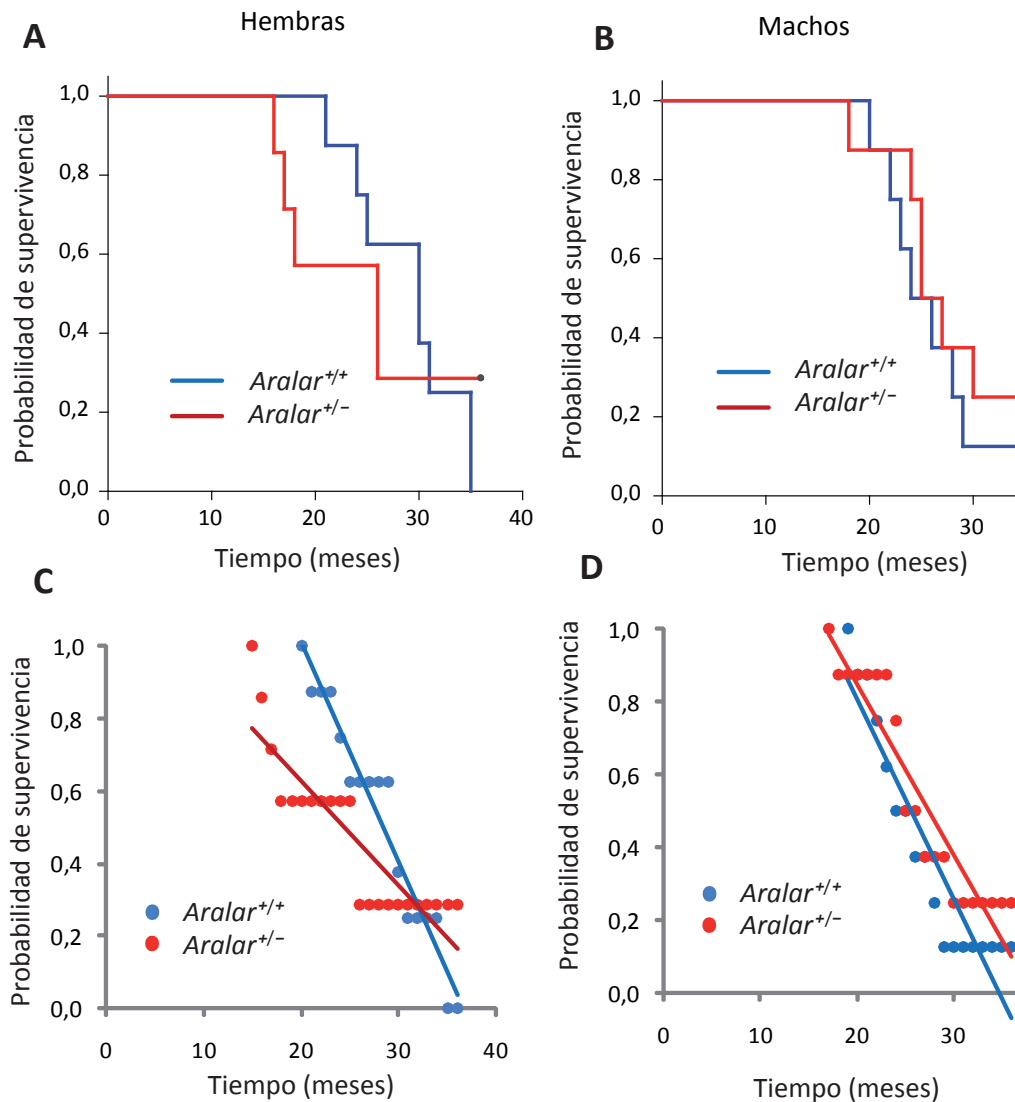


Figura 40. Curvas de envejecimiento. Curvas de envejecimiento Kaplan-Meier para el grupo de hembras *Aralar*^{+/+} (azul) y *Aralar*^{+/-} (rojo) (A) y para el grupo de machos *Aralar*^{+/+} (azul) y *Aralar*^{+/-} (rojo) (B). C y D son las correspondientes regresiones lineales de los datos de supervivencia.

se observa en este estudio en las hembras (figura 40A).

En el caso de las hembras *Aralar*^{+/+}, la vida media es de $28,88 \pm 1,81$ meses y en las hembras *Aralar*^{+/-} de $25,00 \pm 3,34$ meses, Los machos *Aralar*^{+/+} y *Aralar*^{+/-} viven $26,00 \pm 1,80$ meses y $27,63 \pm 2,23$ meses, respectivamente (análisis LogRank de Kaplan-Meier, SigmaStat 3.1). Las regresiones lineales correspondientes a las curvas de envejecimiento están representadas en la tabla 11.

Por lo tanto, no se confirma una mayor longevidad en ratones hemizigotos para *Aralar*.

Tabla 11. Regresión lineal de las curvas de envejecimiento

	<i>Hembras</i>	<i>Machos</i>
<i>Aralar</i> ^{+/+}	$y = -0,0604x + 2,212$ $R^2 = 0,9467$	$y = -0,0543x + 1,8893$ $R^2 = 0,8752$
<i>Aralar</i> ^{+/-}	$y = -0,029x + 1,207$ $R^2 = 0,7888$	$y = -0,0463x + 1,7716$ $R^2 = 0,891$

Discusión

Discusión

Aralar, como transportador de aspartato-glutamato mitocondrial, es responsable del paso irreversible y controlador de MAS. En la célula- β , las lanzaderas redox son responsables de la transferencia de equivalentes redox desde el citosol a la matriz mitocondrial, sea en forma de NADH (MAS) o de FADH₂ (lanzadera glicerol-fosfato) mitocondriales y forman parte del acoplamiento metabolismo-secreción necesario para la secreción de insulina. Aralar, y la glicerol-fosfato deshidrogenasa, están embebidos en la membrana mitocondrial interna, y ambos tienen sitios de interacción con los sustratos (aspartato/glutamato y glicerol fosfato/dihidroxiacetona, respectivamente) en el espacio intermembrana. Además, ambas tienen motivos que unen Ca²⁺, también hacia el espacio intermembrana.

Hasta la fecha, sólo los transportadores mitocondriales aralar (Marmol *et al.*, 2009; Rubi *et al.*, 2004), de citrato/isocitrato (CIC) (Joseph *et al.*, 2006), y el transportador de glutamato, GC1 (Casimir *et al.*, 2009a), han sido implicados en la secreción de insulina.

En esta Tesis, se ha estudiado el efecto de la deficiencia de aralar en células- β INS-1 y el efecto de su regulación por Ca²⁺ en las propiedades metabólicas de esas células y en su capacidad de secreción de insulina. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la pérdida de una dosis génica de *Aralar* como factor de riesgo para diabetes tipo 2 (T2D).

1. Deficiencia de *Aralar* en la célula- β

La falta de aralar en la célula- β no ha podido ser estudiada *in vivo*, ya que los ratones *Aralar*^{-/-} tienen corta longevidad (alrededor de 20 días) y presentan muchas anomalías (Jalil *et al.*, 2005). Por lo tanto, en esta Tesis se ha desarrollado un modelo celular de deficiencia en aralar: el *knock-down* de aralar en las células INS-1. Los resultados obtenidos indican que la deficiencia de aralar en células INS-1 provoca una pérdida completa de la actividad MAS, una disminución del 25 % en GSIS, y un descenso del 20 % en el NAD(P)H mitocondrial en respuesta a glucosa. Se ha propuesto (Eto *et al.*, 1999) que las contribuciones del ciclo TCA y del sistema de lanzaderas de NADH a la producción de ATP mitocondrial podría ser aproximadamente la misma en el estado fisiológico. Dado el papel predominante de la lanzadera de NADH malato-aspartato en el acoplamiento metabolismo-secreción, es sorprendente encontrar que la falta de aralar en presencia de Ca²⁺ extracelular da lugar a un descenso de sólo el 20-25 % en GSIS y en el aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial en respuesta a glucosa (Marmol *et al.*, 2009). Sin embargo, este resultado ha sido recientemente confirmado por otro grupo (Casimir *et al.*, 2009b).

En este sentido, hemos encontrado que la deficiencia en aralar no causa variaciones en la hiperpolarización mitocondrial (figura 23) o en la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria inducidas por glucosa en células intactas (figura 29), así como tampoco en la capacidad de oxidar $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucosa a $^{14}\text{CO}_2$ (figura 31). Además, aunque la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria en células INS-1 aralar KD deja de ser sensible a un inhibidor de aminotransferasas, aminooxiacetato, la magnitud de la entrada de Ca^{2+} mitocondrial es indistinguible de la observada en las células Wt 24. Todos estos resultados indican que es posible que estas células hayan desarrollado un mecanismo compensatorio ante la falta de aralar, en virtud del cual la falta de MAS se compensa por la expresión de otra lanzadera. Posiblemente, mediante el incremento en los niveles de la glicerol-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPD, componente de la lanzadera glicerol-fosfato), algo que ya se ha observado en los cerebros de los ratones *Aralar*^{-/-} (Contreras, Satrústegui, resultados no publicados). Si este efecto compensatorio se produjese, la formación de piruvato y su utilización mitocondrial no se verían afectadas, con lo que la producción de CO_2 tampoco lo estaría; la hiperpolarización mitocondrial se realizaría a costa de la lanzadera de glicerol-fosfato y la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria no se vería disminuída.

Por otro lado, la presencia de estos posibles mecanismos compensatorios sugiere que el efecto *in vivo* de aralar es posiblemente mayor que el que detectamos en este estudio, de acuerdo con los efectos acusados que produce la sobre-expresión de aralar de forma transitoria (Rubi *et al.*, 2004) y con las conclusiones de los estudios del grupo de Kadowaki (Eto *et al.*, 1999) en ratones *mGPD*^{-/-}, carentes de la lanzadera de glicerol-fosfato.

Sin embargo, otra razón por la cual la deficiencia en aralar tiene menor efecto en la secreción de insulina que el previsto está relacionada con: a) el papel importante del glutamato en la célula- β y en la secreción de insulina, y b) el reciclaje del piruvato y su papel en la secreción de insulina.

1.1. Papel del glutamato en la célula- β

Se ha descrito que el glutamato en la célula- β tiene un papel importante como mensajero estimulando la exocitosis de insulina inducida por glucosa, de manera independiente a la actividad de los canales de $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ y *downstream* a la función mitocondrial (Maechler y Wollheim, 1999; Maechler y Wollheim, 2000). La vía del glutamato podría ser esencial para que la respuesta de secreción de insulina tenga lugar de manera completa aunque su papel en la célula- β se sigue debatiendo (Henquin, 2000).

De acuerdo con esta teoría, el glutamato se formaría en la mitocondria a partir de α -KG por la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH), que actuaría favoreciendo la

formación de glutamato en lugar de su degradación a α -KG, y este glutamato saldría de la mitocondria para jugar un papel en la vía de amplificación de GSIS (Carobbio *et al.*, 2009; Maechler y Wollheim, 1999; Maechler y Wollheim, 2000). El grupo de Pierre Maechler ha demostrado la importancia de la GDH en este mecanismo mediante la generación de un ratón con delección específica de GDH en célula- β , β Glud1^{-/-} (Carobbio *et al.*, 2009). Este ratón tiene una disminución en GSIS del 40 %, aunque, curiosamente, los niveles de glucosa plasmática no se ven afectados, al menos en animales menores de 12 meses (Carobbio *et al.*, 2009). Además, la ADP-ribosilación de GDH por una de las sirtuinas de mamíferos, SIRT4, una sirtuina mitocondrial que no tiene actividad NAD-desacetilasa, conduce a una inhibición de la enzima y a una disminución de la GSIS (Haigis *et al.*, 2006). Una estrategia alternativa para comprobar la importancia de la generación de glutamato en la mitocondria es la sobre-expresión de la glutamato descarboxilasa (GAD). En células INS-1E (Rubi *et al.*, 2001) dicha sobre-expresión provoca una reducción de los niveles mitocondriales de glutamato y también produce una inhibición en GSIS (~ 30%) similar a la del ratón β Glud1^{-/-}, en tanto que los ratones con sobre-expresión específica en célula- β de GAD son intolerantes a la glucosa y muestran GSIS defectuosa (Shi *et al.*, 2000).

En cuanto al transportador mitocondrial de glutamato responsable del mecanismo de generación de glutamato como molécula señalizadora, hay dos transportadores de glutamato en las mitocondrias de la célula- β , el intercambiador $\text{Glut}_{\text{out}}/\text{Asp}_{\text{in}}$ (AGC1, aralar) y los uniportadores de glutamato (GC1 y GC2). Los GCs catalizan el transporte de glutamato mediante simporte con un H^+ o mediante antiporte con OH^- , por lo que su distribución a través de la membrana mitocondrial está influenciado por el ΔpH , y la entrada de glutamato está favorecida en mitocondrias energizadas (Fiermonte *et al.*, 2002). El uniportador de glutamato es el único mecanismo capaz de sacar glutamato de la mitocondria energizada, ya que en esa situación el AGC es irreversible, actuando sólo en la dirección de entrada de glutamato a la mitocondria.

Páncreas e hígado tienen más altos niveles de expresión de GC1 que cerebro, donde ambas isoformas del GC, GC1 y GC2 se co-expresan (Fiermonte *et al.*, 2002). Se han mostrado claras evidencias de la gran expresión de GC1 en células secretoras de insulina procedentes de rata, tanto en células INS-1E como en islotes pancreáticos (Casimir *et al.*, 2009a). De hecho, la actividad de transporte de glutamato a través de GC1 es 3-4 veces mayor que a través de aralar ($\text{Glut}_{\text{out}}/\text{Asp}_{\text{in}}$) en liposomas reconstituidos con las proteínas mitocondriales de células INS-1 (Casimir *et al.*, 2009a). De acuerdo con su propuesta implicación en la generación de glutamato señalizador, el silenciamiento de GC1 da como resultado una reducción del 23 % en GSIS sólo a altas concentraciones de glucosa (15 mM, óptima) en células INS-1E (Casimir *et al.*, 2009a).

Así como el AGC es unidireccional en mitocondrias polarizadas, GC1 y GDH pueden actuar en las dos direcciones. Actuando en la dirección de entrada de glutamato, GC1 junto con GDH podrían generar un mecanismo compensatorio parcial (independiente de la lanzadera de glicerol-fosfato) para la transferencia de poder redox desde el citosol a la mitocondria.

De hecho, en mitocondrias aisladas y en presencia de aspartato externo, esta ruta de entrada de glutamato genera una oxidación considerable del NADH extramitocondrial (figura 41). En esta figura se incluye la posible participación de la fosfoenol piruvato carboxiquinasa

Fuente alternativa de glutamato en la mitocondria de las células INS-

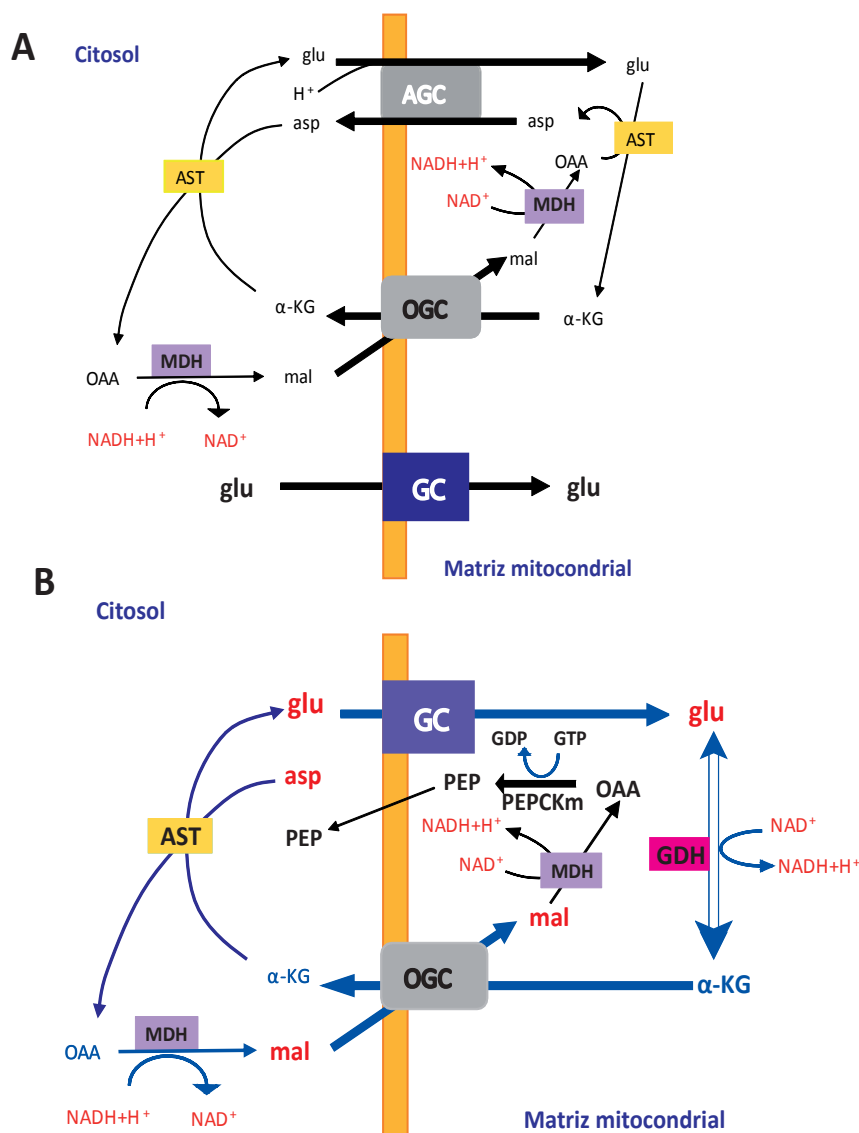


Figura 41. Fuente alternativa de glutamato en la mitocondria de las células INS-1. A, Transferencia de NADH a la mitocondria llevada a cabo por MAS. La presencia de una fuente alternativa de glutamato hace que eventualmente, éste pueda ser transformado a α -cetoglutarato (α -KG) por la glutamato deshidrogenasa (GDH). B, El glutamato que entra por el GC en presencia de aspartato externo en mitocondrias aisladas puede crear un ciclo independiente de la lanzadera que consume NADH externo.

mitocondrial (PEPCKm) (Stark *et al.*, 2009), que puede utilizar el GTP mitocondrial formado por la succinil-CoA sintetasa mitocondrial (Kibbey *et al.*, 2007); ambas implicadas en GSIS, para explicar el destino del OAA mitocondrial.

1.2. Efectos del reciclaje del piruvato sobre la vía aralar-MAS

Existen múltiples líneas de evidencia que sugieren, que además de la vía clásica, que implica el aumento en la razón ATP/ADP y la inhibición de los canales K_{ATP} como mecanismo de GSIS; existen otras moléculas señalizadoras que amplifican GSIS (Ronnebaum *et al.*, 2006). Se considera que muchos de estos segundos mensajeros se originan por la exportación de intermediarios del ciclo TCA de la mitocondria al citosol (Brun *et al.*, 1996; MacDonald, 1995; MacDonald *et al.*, 2005; Prentki *et al.*, 1992; Wollheim y Maechler, 2002). Tal pérdida de estos metabolitos del ciclo TCA ha de ser compensada por una entrada equivalente de sustratos (anaplerosis), para prevenir la depleción de los intermediarios del ciclo y un efecto de detrimento en la generación de ATP (Pongratz *et al.*, 2007), y asegura que no se interrumpa la exportación de los intermediarios (Macdonald, 2003).

Aproximadamente la mitad del piruvato derivado de la glucosa que entra en el metabolismo mitocondrial se carboxila mediante la piruvato carboxilasa (PC) (Jitrapakdee *et al.*, 2006) para formar OAA, que se combina con acetil-CoA y forma citrato, y de esta manera se aumenta la tasa de síntesis de cualquier intermediario del ciclo TCA (Khan *et al.*, 1996; MacDonald, 1993a; MacDonald, 1993b; MacDonald, 1993c; MacDonald, 1995). La anaplerosis dependiente de la PC y de los pasos de transporte metabólico, podría ser la fuente de factores que actúan como un medio de comunicación entre la mitocondria activada y la exocitosis de gránulos de insulina (Wiederkehr y Wollheim, 2008). La conversión de intermediarios del ciclo TCA de nuevo a piruvato en el citosol hace que exista el reciclaje del piruvato, que ha sido implicado como un componente importante de GSIS (Farfari *et al.*, 2000). El reciclaje del piruvato implica las vías piruvato/malato (MacDonald, 1995), piruvato/citrato (Farfari *et al.*, 2000) y piruvato/isocitrato (Ronnebaum *et al.*, 2006) representadas en la figura 42, de las cuales la tercera, la vía piruvato/isocitrato (Jensen *et al.*, 2008), parece la vía predominante en la célula- β (Jensen *et al.*, 2008). El funcionamiento de estas vías, y especialmente, de la vía piruvato/isocitrato implica a la PC, al transportador mitocondrial de citrato/isocitrato (CIC), a la isocitrato deshidrogenasa citosólica dependiente de NADP (NADP-IDH), al enzima málico citosólico (MEc) o mitocondrial (ME_m), y posiblemente, a transportadores mitocondriales de malato o malato/ α -KG (transportador de dicarboxilatos y OGC, respectivamente), los cuales están implicados en GSIS, especialmente a cargas altas de glucosa (Jensen *et al.*, 2006; Joseph *et al.*, 2006; Muoio y Newgard, 2008; Pongratz *et al.*, 2007; Ronnebaum *et al.*, 2006; Schuit *et al.*, 1997). Estas vías, y principalmente la tercera (vía piruvato/isocitrato, figura 42C), implican que algunas de las reacciones mitocondriales

A Ciclo Piruvato/malato

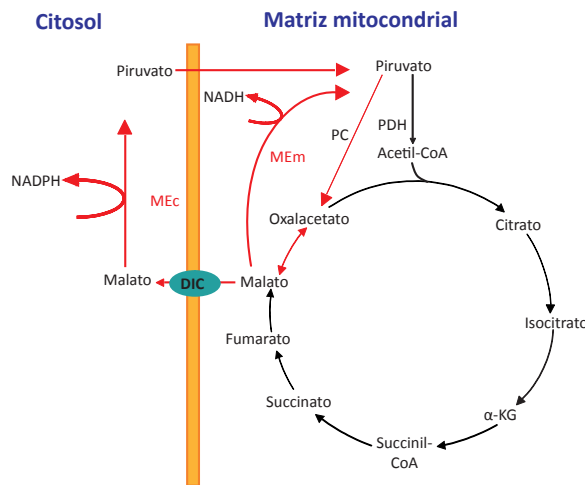
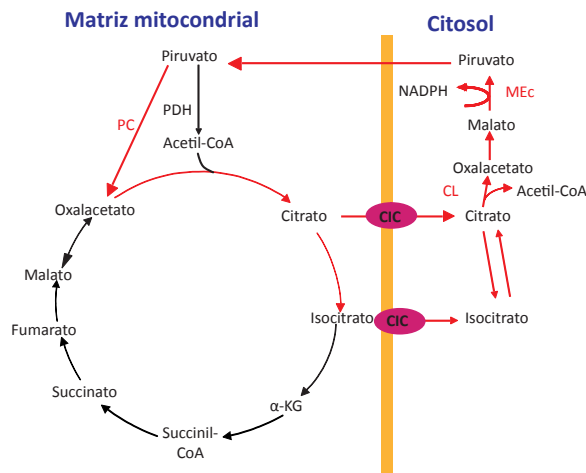


Figura 42. Diagramas de las vías de reciclaje del piruvato en la célula-β

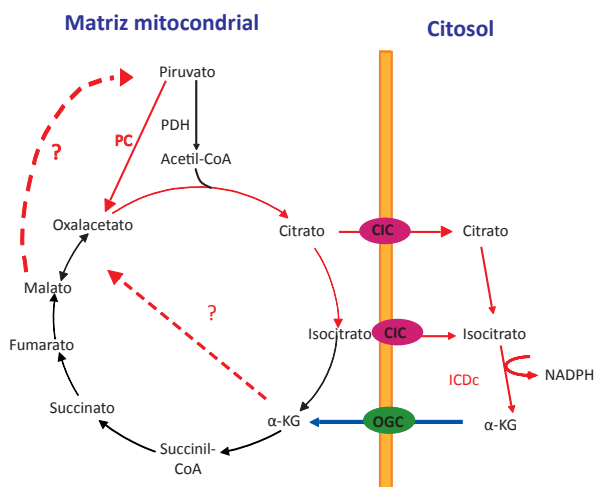
A. Ciclo piruvato/malato. El piruvato entra en el ciclo TCA mediante la conversión a oxalacetato (OAA) por la piruvato carboxilasa (PC). El OAA ha de ser reducido a malato para salir de la mitocondria. El malato generado puede ser reciclado a piruvato por el enzima málico mitocondrial (MEM) o puede ser transportado al citosol por el transportador de dicarboxilatos (DIC). En el segundo caso, el malato puede ser reconvertido a piruvato por la forma citosólica del ME (MEc).

B Ciclo Piruvato/citrato



B. Ciclo piruvato/citrato. El piruvato entra al ciclo TCA mediante carboxilación por la PC. El OAA resultante se condensa con acetil-CoA para formar citrato e isocitrato, los cuales pueden salir de la mitocondria por el transportador de citrato/isocitrato (CIC). Una vez en el citosol, el citrato se escinde en OAA y acetil-CoA por la ATP-citrato liasa (CL). El OAA se recicla a piruvato mediante la conversión a malato y las reacciones de MEM o MEc.

C Ciclo Piruvato/isocitrato



C. Ciclo piruvato/isocitrato. El ciclo comienza con la conversión de piruvato a OAA por la PC. Como en el ciclo piruvato/citrato, el citrato o isocitrato pueden salir de la mitocondria por el CIC. El citrato se convierte a isocitrato por la aconitasa citosólica, y el isocitrato a α-cetoglutarato (α-KG) por la isocitrato deshidrogenasa citosólica (IDHc). El α-KG posteriormente re-entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos mitocondrial y finalmente es convertido de nuevo a piruvato por el ME.

(Figura adaptada de Jensen *et al.*, 2008).

que producen NAD(P)H ahora tendrían lugar en el citosol, de hecho transfiriendo NADH mitocondrial a NADPH citosólico, y por lo tanto, reduciendo el impacto de la lanzadera redox MAS en los niveles de NAD(P)H mitocondrial. Además, la producción de α -KG por la enzima NADP-IDH citosólica (Ronnebaum *et al.*, 2006) podría de hecho inhibir el flujo de α -KG a través del OGC, el segundo transportador mitocondrial implicado en MAS, lo que limitaría también la actividad de MAS en condiciones en las que haya una alta actividad de piruvato. Estas razones podrían explicar la limitada contribución de la vía aralar-MAS al aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa en presencia de Ca^{2+} y a la falta de efecto de los mutantes de aralar en la unión a Ca^{2+} en este proceso.

2. Regulación por Ca^{2+} de aralar

2.1. La vía Aralar-MAS en células intactas tiene un requerimiento absoluto de Ca^{2+}

El aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa en un medio libre de Ca^{2+} , *i.e.*, en ausencia de señales de Ca^{2+} dependientes de glucosa citosólicas o mitocondriales, disminuye su valor en un 60% aproximadamente respecto al obtenido en presencia de Ca^{2+} extracelular.

Esta diferencia se correlaciona con el descenso en la producción de CO_2 a partir de D-[6- ^{14}C] glucosa en un medio libre de Ca^{2+} , descrito previamente en islotes pancreáticos intactos a concentraciones estimuladoras de glucosa (Sener *et al.*, 1990); pero contrasta con los resultados de Gilon y Henquin (Gilon y Henquin, 1992), que encontraron que el aumento estimulado por glucosa de NAD(P)H en islotes pancreáticos de ratón se mantenía en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

En islotes pancreáticos, como en otros tipos celulares (Denton y McCormack, 1986; Denton *et al.*, 1980; McCormack, 1985), la activación del metabolismo mitocondrial por Ca^{2+} permite una oxidación incrementada de sustratos, gracias a la activación por Ca^{2+} de las deshidrogenasas mitocondriales, como respuesta a una mayor demanda energética de la célula.

En esta Tesis se demuestra que el aumento en la formación de NAD(P)H mitocondrial inducido por glucosa, es claramente dependiente de señales de Ca^{2+} citosólicas y/o mitocondriales. El hecho de que esta generación de NAD(P)H mitocondrial en un medio libre de Ca^{2+} no se reduzca en células aralar KD, sugiere que MAS no participa en este proceso. Por lo tanto, el aumento en la formación de NAD(P)H mitocondrial en un medio libre de Ca^{2+} correspondería a la oxidación en la mitocondria del piruvato derivado de la glucosa, lo que se denomina *glucose push* (Wiederkehr y Wollheim, 2008). A concentraciones de

glucosa por encima de 10 mM, a las cuales el paso limitante de la glicolisis ya no está establecido por la glucoquinasa, la oxidación del piruvato es entonces el paso limitante para la formación de ATP o de intermediarios derivados de la glucosa (Antinozzi *et al.*, 2002; Heart *et al.*, 2007; Wiederkehr y Wollheim, 2008). La regulación positiva del metabolismo mitocondrial podría requerir la potenciación por Ca^{2+} . En ausencia de Ca^{2+} , la oxidación del piruvato podría limitar la producción de NAD(P)H mitocondrial, de manera independiente de la actividad de MAS, lo que explicaría la falta de efecto que tiene el *knock-down* de aralar en estas condiciones. En otras palabras, parece que el *glucose push* es insuficiente para activar la vía aralar-MAS y que se requiere Ca^{2+} para hacerla operativa mediante el incremento de su V_{max} (Contreras *et al.*, 2007).

2.2. Se requieren señales de Ca^{2+} citosólicas para acoplar la actividad de MAS a la utilización de glucosa

El aumento inicial en el Ca^{2+} citosólico producido por la glucosa es precedido por la activación mitocondrial provocada por el suministro de sustratos (ley de acción de masas) y es seguido por la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria a través del uniportador de Ca^{2+} . En esta Tesis, se muestra que la vía aralar-MAS es importante para la transferencia de poder redox de NAD(P)H a la mitocondria en la célula- β durante la estimulación por glucosa. En particular, en condiciones donde se evita la entrada de Ca^{2+} inducida por glucosa a la mitocondria, pero se evocan pequeños aumentos de Ca^{2+} citosólico inducidos por ATP al tiempo de la adición de la glucosa. El aumento único en forma de espiga de Ca^{2+} citosólico que se observa en estas condiciones da lugar a un aumento en el Ca^{2+} mitocondrial muy pequeño, mucho menor (despreciable si se comparan) que el que se obtiene como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} inducida por glucosa a la mitocondria (apartado 7.2. de Resultados). De hecho, se ha encontrado que el aumento en la generación de NAD(P)H mitocondrial que se obtiene en estas condiciones en células Wt 24 es grande y comparable al que tiene lugar durante una señal de Ca^{2+} mitocondrial robusta tras la estimulación con glucosa (apartado 7.2. de Resultados). Estos resultados muestran que la falta de aralar bloquea una fracción sustancial (aproximadamente el 50 %) de la generación de NAD(P)H mitocondrial producida por glucosa en presencia de estas señales pequeñas de Ca^{2+} , pero tiene un efecto mucho más pequeño en presencia de señales “grandes” de Ca^{2+} mitocondriales (disminución del 20 %). Debido a que la falta de aralar se vuelve muy significativa en condiciones en las que el aumento del Ca^{2+} mitocondrial se ve drásticamente reducido, estos resultados sugieren de manera evidente que la vía aralar-MAS es responsable de transducir a la mitocondria señales de Ca^{2+} citosólico y no de Ca^{2+} mitocondrial. El papel del Ca^{2+} extramitocondrial en la actividad de la vía aralar-MAS es además corroborado por los resultados obtenidos con las células Mut 37. La mutación del par de motivos EF1-EF2, que se postula que es el

único funcional en términos de unión a Ca^{2+} (Contreras *et al.*, 2007), provoca alteraciones en la estructura del extremo N-terminal de aralar que hace que la proteína mutada ya no sea reconocida por el anticuerpo anti-aralar, dirigido contra dicha región (del Arco y Satrustegui, 1998).

La activación por Ca^{2+} de la lanzadera en mitocondrias aisladas de células Mut 37 está completamente bloqueada, mientras que se mantiene una actividad transportadora basal similar a la que tienen las mitocondrias de las células Wt 24. Resulta muy interesante que tampoco en células INS-1 intactas este mutante es capaz de realizar la transferencia redox a la mitocondria en respuesta a señales pequeñas de Ca^{2+} , y se observa una reducción en la transferencia de NAD(P)H de aproximadamente el 42 %.

3. Potenciación de GSIS por agonistas purinérgicos

De entre los mecanismos que modulan GSIS, el sistema de receptores purinérgicos P2 ha sido propuesto y caracterizado ya tiempo atrás (Chapal y Loubatieres-Mariani, 1981; Loubatieres-Mariani *et al.*, 1979), actuando probablemente mediante la acción diferencial y opuesta, de sus dos subtipos, P2X (receptores ionotrópicos, canales iónicos accionados por ligando) y los P2Y (receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G). Concretamente, se ha descrito una potenciación de GSIS por la activación de los receptores P2Y tanto en páncreas aislado de rata (Bertrand *et al.*, 1987) como en islotes humanos (Fernandez-Alvarez *et al.*, 2001). El agonista UTP, es preferente para los receptores purinérgicos del tipo P2Y (en concreto, preferido para los P2Y2 y P2Y4, y un estímulo eficiente para los P2Y6 (Sak y Webb, 2002) y produce en células INS-1E una potenciación en GSIS en un amplio rango de concentraciones de glucosa (3.3, 7.5, 11 y 20 mM; Santini *et al.*, 2009).

Para investigar el posible papel fisiológico de la activación por Ca^{2+} de aralar en GSIS, se ha estudiado la potenciación por UTP de GSIS, encontrándose que se potencia claramente en células Wt 24, mientras que su efecto no es detectable en las células Mut 37 que tienen los motivos EF mutados (apartado 9 de Resultados). Sin embargo, no se ha podido concluir nada definitivo de estos experimentos, ya que la línea Mut 37 tiene también una reducción en la secreción de insulina en respuesta a KCl y alta glucosa (11 o 15 mM), un efecto independiente de las mutaciones en los motivos EF que enmascara cualquier efecto específico.

4. Efectos en la homeostasis de la glucosa en ratones con deficiencia parcial de aralar

Los datos de esta Tesis descartan que la carencia de una dosis génica de *Aralar* sea un factor de riesgo para la T2D, incluso en condiciones de lipotoxicidad, factor que se conoce que actúa creando disfunción pancreática. Tanto los ratones machos como las hembras, de ambos genotipos, sometidos a un período de tiempo muy extenso de alimentación con una dieta grasa (HF), mantienen la glucemia basal a expensas de una elevada insulinemia.

Esto concuerda con los resultados anteriores, en los que se observa que incluso una reducción de aralar hasta niveles no detectables (células aralar KD) da lugar a una disminución de sólo el 20% en GSIS. Por tanto, no es de esperar que la carencia de una dosis de *Aralar* comprometa en exceso la secreción de insulina en el páncreas, teniendo en cuenta los mecanismos expuestos en el apartado 1 de Discusión.

Sin embargo, los resultados obtenidos indican, como se discute a continuación, que podría existir una modificación en la sensibilidad a insulina en los ratones hemizigotos debida a la disminución de los niveles de aralar en tejidos periféricos (músculo, dado que aralar no se expresa en hígado ni en adipocitos; del Arco *et al.*, 2002).

Por ello, se tendrán que considerar, en primer lugar, el fondo genético de los ratones que se han utilizado C57BL/6xSv129; y en segundo lugar, el efecto de sólo una dosis génica de *Aralar* en este fondo C57BL/6xSv129.

4.1. Particularidades de la cepa y del género.

Ratones machos C57BL/6xSv129 como posible modelo de síndrome metabólico.

Aunque los ratones de este estudio, independientemente del genotipo y de la dieta, no desarrollaron diabetes; se han observado diferencias metabólicas muy notables dependientes de la edad entre machos y hembras.

Los machos de los dos genotipos tenían ya un perfil metabólico que sugiere la presencia de resistencia a la insulina a la edad de 6 meses, que se mantuvo a lo largo de su vida, hasta los 18 meses. Su perfil metabólico reproduce fielmente los datos descritos por Almind y Kahn (Almind y Kahn, 2004), que también encontraron que los ratones de fondo genético C57BL/6xSv129 aumentaban de peso (con dieta control) más que las hembras, y desarrollaban hiperinsulinemia en esa misma dieta, como se muestra en la figura 43, que recoge los datos combinados de esta Tesis y de Almind y Kahn (adaptación de la figura 2 de Almind y Kahn, 2004). Además se hacen intolerantes a la glucosa ya desde los 6 meses (figura 38).

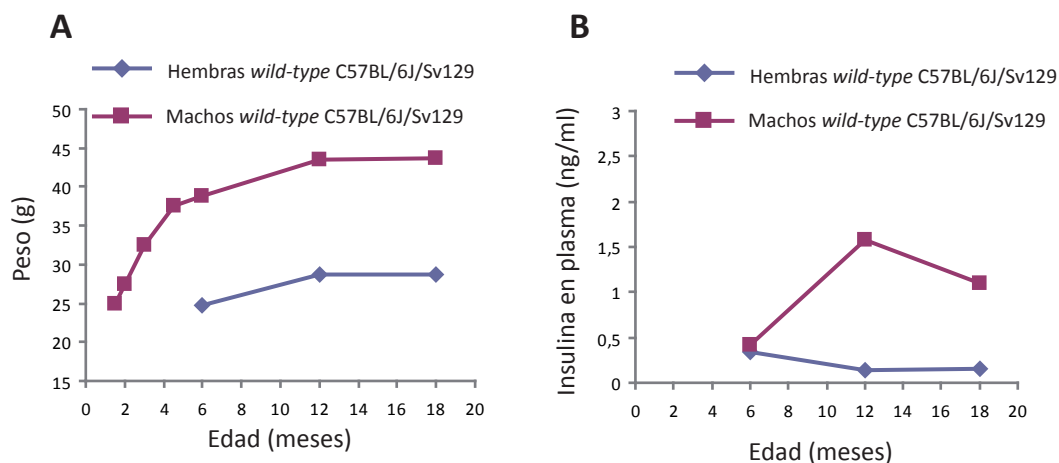


Figura 43. Evolución del peso y de los niveles de insulina en plasma con la edad en ratones C57BL/6xSv129. A. Aumento del peso corporal en ratones *wild-type*, hembras (azul) y machos (rojo) (Figura adaptada de Almind y Kahn, 2004). B. Niveles de insulina en plasma tras un ayuno durante la noche en ratones *wild-type*, hembras (azul) y machos (rojo).

Con el test de tolerancia a insulina (ITT), Almind y Kahn demostraron que esta intolerancia a la glucosa se debe a una resistencia periférica a la insulina (Almind y Kahn, 2004). También demostró que de los dos fondos genéticos de estos ratones híbridos, el C57BL/6 es el responsable de esa resistencia a la insulina.

Curiosamente, el fenotipo de las hembras (independientemente del genotipo) no es consistente con el desarrollo de resistencia a la insulina. En otros estudios con la cepa C57BL/6, tanto pura como híbrida, también se ha encontrado que las hembras no desarrollan resistencia a la insulina, al menos antes de los 8 meses (Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2008). Sin embargo, en esta Tesis se muestra que la dieta HF las convierte en animales con posible resistencia a la insulina de forma dependiente del envejecimiento, ya que fueron necesarios 12 meses de dieta HF para que llegasen a niveles parecidos de insulina plasmática a los que tienen los machos. No obstante, se requieren más experimentos para demostrar que efectivamente se trata de resistencia a la insulina.

De aquí puede concluirse que los machos C57BL/6xSv129 sedentarios y en dieta control son un buen modelo de síndrome metabólico, como también podrían serlo las hembras del mismo fondo genético sometidas a dieta HF durante largo tiempo. Uno de los intereses del laboratorio desde hace muchos años ha sido el estudio de la resistencia a insulina durante el envejecimiento, y más recientemente, los efectos de la restricción calórica sobre la misma (Carrascosa *et al.*, 1989; Escriva *et al.*, 2007), algo que se ha estudiado siempre en ratas Wistar, que constituyen un buen modelo de la resistencia a insulina en humanos. A la vista de los resultados de esta Tesis, los ratones machos del genotipo C57BL/6xSv129 sedentarios y en dieta control podrían ser un modelo equivalente, con la ventaja añadida de

la disponibilidad de un gran número de cepas con disrupciones génicas.

4.2. Efecto de una dosis de *Aralar* en el fondo C57BL/6xSv129

La perdida de una dosis de Aralar parece conferir mayor sensibilidad a la insulina en los ratones insulino-resistentes C57BL/6xSv129

Se ha observado que los ratones que se acaban de denominar como insulino-resistentes, es decir, los machos con dieta control y las hembras sometidas a dieta HF por largo tiempo; parecen más sensibles a la insulina cuando les falta una dosis génica de *Aralar* (figuras 37 y 39). El posible aumento en la sensibilidad a la insulina necesita claramente verificarse con tests apropiados (ITT u otros). Sin embargo, la consistencia de los datos obtenidos en estos dos modelos sugiere que la interpretación puede ser correcta.

En el caso de los machos, la posible mayor sensibilidad a la insulina de los ratones hemizigotos se asocia con una tendencia a un peso global menor (figura 35) y con una menor secreción de insulina para mantener los mismos niveles de glucosa (figura 39), es decir, se trata de una posible reversión del fenotipo *thrifty* con el que Almind y Kahn describen al ratón macho C57BL/6xSv129 (Almind y Kahn, 2004).

El fenotipo *thrifty*, se caracteriza por una mayor ganancia de peso por caloría consumida durante el desarrollo, es decir, es un fenotipo de propensión a la obesidad aunque no existan aumentos en la ingesta calórica; lo cual constituiría una ventaja evolutiva en tiempos de escasez de alimentos (Hales y Barker, 1992). En los ratones machos C57BL/6 el fenotipo *thrifty* se relaciona con una tasa metabólica basal más baja (Almind y Kahn, 2004).

Discusión

Otro modelo de fenotipo *thrifty* es el de los ratones deficientes en la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPD) producidos en un fondo C57BL/6 (Eto *et al.*, 1999).

Debido a que los equivalentes redox a partir del glicerol-3-fosfato (G3P) entran en la cadena respiratoria a nivel del complejo III, se generan sólo 2, en vez de 3 ATPs por átomo de oxígeno o par de electrones utilizados, con lo que la energía del tercer ATP perdido se disipa como calor; esto es, la eficiencia de generación de ATP por esta vía es más baja que cuando los equivalentes redox entran a la cadena respiratoria en el complejo I.

Los ratones *mGPD*^{-/-} tienen defectos en termogénesis (Alfadda *et al.*, 2004; DosSantos *et al.*, 2003). La deficiencia de mGPD, da lugar a un gasto menor de energía (QO2), asociado probablemente con la menor capacidad termogénica de estos animales (Alfadda *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2002; DosSantos *et al.*, 2003).

La dieta grasa exagera el defecto termogénico que presentan los ratones *mGPD*^{-/-}, pero solo en las hembras *mGPD*^{-/-} ya que aumentan más de peso que las *wild-type* cuando se alimentan con una dieta HF (Alfadda *et al.*, 2004). La exacerbación del fenotipo *thrifty* en ratones hembras se justifica por la mayor dependencia de la lanzadera de glicerol-fosfato en su músculo, sobre todo ante una dieta con un mayor aporte energético procedente de las grasas. De hecho, la dieta grasa induce una respuesta termogénica en ratones consistente con el aumento de los niveles del RNAm de la mGPD en hígado y músculo (Alfadda *et al.*, 2004) mientras que los niveles del RNAm para aralar, el componente limitante de MAS, se reducen drásticamente tanto en músculo de ratón como en el humano (Sparks *et al.*, 2005). Esto genera la respuesta termogénica muscular y hepática a la dieta grasa en la que aumenta la lanzadera glicerol-fosfato y disminuye MAS (Iossa *et al.*, 1995; Sparks *et al.*, 2005), con la consiguiente pérdida de energía.

Dado que aralar no se expresa en hepatocitos ni en tejido adiposo (del Arco *et al.*, 2002; Satrustegui *et al.*, 2007), dos de los tejidos responsables de los efectos de la dieta grasa en termogénesis y resistencia a insulina, parece probable que el músculo sea el principal responsable del aumento de la sensibilidad a insulina en los ratones hemizigotos para aralar.

Estas consideraciones pueden explicar los efectos de la deficiencia de mGPD y de la deficiencia parcial de *Aralar* en hembras sometidas a dieta HF de acuerdo con el esquema de la figura 44.

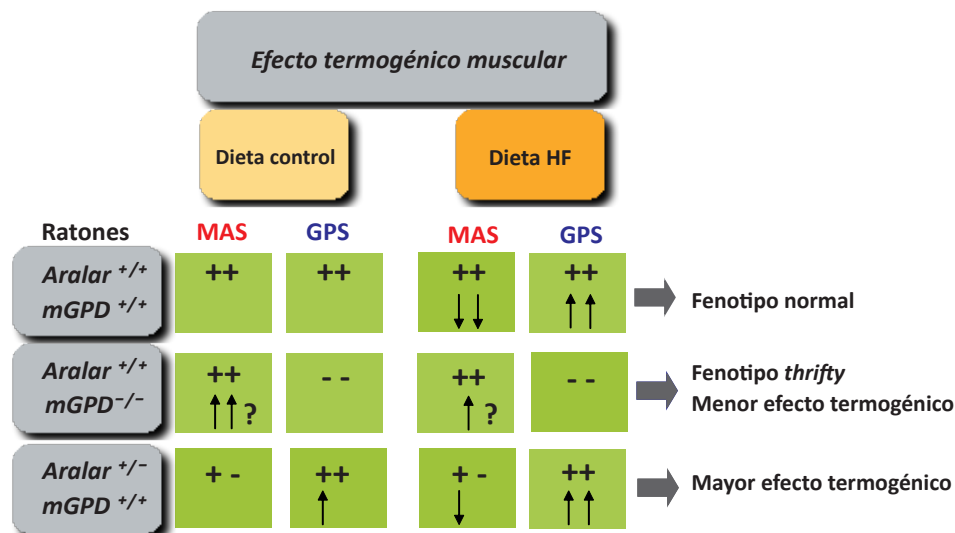


Figura 44. Esquema de la aportación relativa de las lanzaderas redox del músculo esquelético al fenotipo *thrifty*. Los efectos sobre MAS (lanzadera malato-aspartato) y GPS (lanzadera de glicerol-fosfato) debidos a la dosis génica se indican con los símbolos “+” y “-”, y los efectos sobre MAS y GPS independientes de la dosis génica se indican con los símbolos “↑” y “↓”. En el primer caso, tiene lugar una termogénesis muscular normal tanto en dieta en dieta control como HF. En el segundo caso, la falta de GPS y/o el aumento por parte de MAS en esas condiciones daría lugar a una menor termogénesis (fenotipo *thrifty*). En el tercer caso existiría un mayor efecto termogénico que el que tiene lugar en condiciones normales, ya que existiría una mayor disipación de la energía por la existencia de sólo una dosis génica de *Aralar*.

Concluimos que es posible que la carencia de una dosis de *Aralar* produzca una dependencia termogénica muy acentuada de la lanzadera de glicerol-fosfato en hembras con dieta grasa. En ratones con ambas lanzaderas intactas (fenotipo normal), una dieta grasa induce una mayor actividad de la lanzadera de glicerol-fosfato con una reducción concomitante en la de MAS (Iossa *et al.*, 1995; Sparks *et al.*, 2005). El fenotipo *thrifty* aparece cuando los ratones que carecen de la lanzadera de glicerol-fosfato están sometidos a dieta grasa y dependen únicamente de MAS, con lo que tendrían un aprovechamiento mayor de la energía. Por último, en el caso de que los ratones estén sometidos a dieta grasa (reducción de la actividad MAS) y además carezcan de una dosis génica de *Aralar*, la mayor dependencia de la lanzadera de glicerol-fosfato podría causar una reversión del fenotipo *thrifty*.

Esto generaría un fenotipo con mayor metabolismo basal que podría desencadenar una mayor sensibilidad a la insulina en estos ratones.

Conclusiones

Conclusiones

1. En células- β INS-1, la disminución de los niveles de expresión de aralar da lugar a una reducción del 20-25 % en la formación de NAD(P)H en la mitocondria y en la secreción de insulina inducidas por glucosa.
2. La activación por Ca^{2+} de MAS está conferida por los motivos EF que aralar porta en su extremo N-terminal, en concreto, por el par funcional compuesto por los motivos EF1 y EF2, puesto que la mutación de este par da lugar a una abolición en la activación de la actividad de MAS, pero su actividad basal permanece intacta.
3. En ausencia total de Ca^{2+} extracelular, MAS no participa significativamente en la formación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa en células- β INS-1. Dicha formación se puede atribuir al metabolismo del piruvato.
4. La formación de NAD(P)H mitocondrial inducida por glucosa se potencia por señales pequeñas de Ca^{2+} citosólico. Esta potenciación es de igual magnitud a la que tiene lugar en condiciones de alta concentración de Ca^{2+} en el citosol (condiciones fisiológicas), y no ocurre cuando los motivos EF-1 y EF-2 de aralar están mutados.
5. La activación por Ca^{2+} de MAS es independiente de la activación de las deshidrogenasas de la matriz que se produce cuando el Ca^{2+} entra en la mitocondria, y ambos procesos no se excluyen mutuamente.
6. La carencia de una dosis génica de *Aralar* no supone un factor de riesgo para el desarrollo de una disfunción en la secreción de insulina que pueda desencadenar diabetes tipo 2, incluso tras una dieta grasa de 12 meses de duración. Por el contrario, la disminución de los niveles de aralar en músculo, y/o una alimentación con dieta grasa, puede dar lugar a una menor resistencia a la insulina en los ratones *Aralar*^{+/-} dependiente de su género, si se comparan con los ratones *Aralar*^{+/+}.

Referencias

Referencias

- Alfadda, A., DosSantos, R. A., Stepanyan, Z., Marrif, H. y Silva, J. E.** (2004). Mice with deletion of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene exhibit a thrifty phenotype: effect of gender. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R147-56.
- Almind, K. y Kahn, C. R.** (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* **53**, 3274-85.
- Antinozzi, P. A., Ishihara, H., Newgard, C. B. y Wollheim, C. B.** (2002). Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. *J Biol Chem* **277**, 11746-55.
- Arco, A. D. y Satrustegui, J.** (2005). New mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2204-27.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A. y Wollheim, C. B.** (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**, 167-78.
- Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ammala, C., Bokvist, K. y Rorsman, P.** (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* **55 Suppl**, 54-65.
- Baetens, D., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A. y Orci, L.** (1979). Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science* **206**, 1323-5.
- Baslow, M. H.** (2003). N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function. *Neurochem Res* **28**, 941-53.
- Begum, L., Jalil, M. A., Kobayashi, K., Iijima, M., Li, M. X., Yasuda, T., Horiuchi, M., del Arco, A., Satrustegui, J. y Saheki, T.** (2002). Expression of three mitochondrial solute carriers, citrin, aralar1 and ornithine transporter, in relation to urea cycle in mice. *Biochim Biophys Acta* **1574**, 283-92.
- Bergsten, P.** (1995). Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release. *Am J Physiol* **268**, E282-7.
- Bertrand, G., Chapal, J., Loubatieres-Mariani, M. M. y Roye, M.** (1987). Evidence for two different P2-purinoceptors on beta cell and pancreatic vascular bed. *Br J*

Pharmacol **91**, 783-7.

Bogenhagen, D. F., Sakonju, S. y Brown, D. D. (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* **19**, 27-35.

Brandes, R. y Bers, D. M. (1999). Analysis of the mechanisms of mitochondrial NADH regulation in cardiac trabeculae. *Biophys J* **77**, 1666-82.

Briaud, I., Kelpe, C. L., Johnson, L. M., Tran, P. O. y Poitout, V. (2002). Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* **51**, 662-8.

Brown, L. J., Koza, R. A., Everett, C., Reitman, M. L., Marshall, L., Fahien, L. A., Kozak, L. P. y MacDonald, M. J. (2002). Normal thyroid thermogenesis but reduced viability and adiposity in mice lacking the mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **277**, 32892-8.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R. y Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3.

Brun, T., Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B. E., Kim, K. H. y Prentki, M. (1996). Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes* **45**, 190-8.

Burri, R., Steffen, C. y Herschkowitz, N. (1991). N-acetyl-L-aspartate is a major source of acetyl groups for lipid synthesis during rat brain development. *Dev Neurosci* **13**, 403-11.

Carobbio, S., Frigerio, F., Rubi, B., Vetterli, L., Bloksgaard, M., Gjinovci, A., Pournourmohammadi, S., Herrera, P. L., Reith, W., Mandrup, S. et al. (2009). Deletion of glutamate dehydrogenase in beta-cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis. *J Biol Chem* **284**, 921-9.

Carrascosa, J. M., Ruiz, P., Martinez, C., Pulido, J. A., Satrustegui, J. y Andres, A. (1989). Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. *Biochem Biophys Res Commun* **160**, 303-9.

Casimir, M., Lasorsa, F. M., Rubi, B., Caille, D., Palmieri, F., Meda, P. y Maechler, P. (2009a). Mitochondrial glutamate carrier GC1 as a newly identified player in the control of glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*.

Casimir, M., Rubi, B., Frigerio, F., Chaffard, G. y Maechler, P. (2009b). Silencing of the mitochondrial NADH shuttle component Aspartate-Glutamate Carrier AGC1 (or Aralar1) in INS-1E cells and rat islets. *Biochem J*.

Cavero, S., Traba, J., Del Arco, A. y Satrustegui, J. (2005). The calcium-dependent ATP-Mg/Pi mitochondrial carrier is a target of glucose-induced calcium signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **392**, 537-44.

Cline, G. W., Lepine, R. L., Papas, K. K., Kibbey, R. G. y Shulman, G. I. (2004). ¹³C NMR isotopomer analysis of anaplerotic pathways in INS-1 cells. *J Biol Chem* **279**, 44370-5.

Cnop, M. (2008). Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* **36**, 348-52.

Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L. y Pipeleers, D. G. (2001). Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* **50**, 1771-7.

Cnop, M., Vidal, J., Hull, R. L., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Schraw, T., Scherer, P. E., Boyko, E. J., Fujimoto, W. Y. y Kahn, S. E. (2007). Progressive loss of beta-cell function leads to worsening glucose tolerance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **30**, 677-82.

Contreras, L., Gomez-Puertas, P., Iijima, M., Kobayashi, K., Saheki, T. y Satrustegui, J. (2007). Ca²⁺ Activation kinetics of the two aspartate-glutamate mitochondrial carriers, aralar and citrin: role in the heart malate-aspartate NADH shuttle. *J Biol Chem* **282**, 7098-106.

Contreras, L. y Satrustegui, J. (2009). Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways. *J Biol Chem* **284**, 7091-9.

Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M. y Reed, J. C. (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* **62**, 6674-81.

Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. y Koehler, C. M. (2002a). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J* **21**, 942-53.

Curran, S. P., Leuenberger, D., Schmidt, E. y Koehler, C. M. (2002b). The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol* **158**, 1017-27.

Chakraborty, G., Mekala, P., Yahya, D., Wu, G. y Ledeen, R. W. (2001). Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase. *J Neurochem* **78**, 736-45.

Chan, C. B., De Leo, D., Joseph, J. W., McQuaid, T. S., Ha, X. F., Xu, F., Tsushima, R. G., Pennefather, P. S., Salapatek, A. M. y Wheeler, M. B. (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* **50**, 1302-10.

Chapal, J. y Loubatieres-Mariani, M. M. (1981). Effects of phosphate-modified adenine nucleotide analogues on insulin secretion from perfused rat pancreas. *Br J Pharmacol* **73**, 105-10.

D'Adamo, A. F., Jr. y Yatsu, F. M. (1966). Acetate metabolism in the nervous system. N-acetyl-L-aspartic acid and the biosynthesis of brain lipids. *J Neurochem* **13**, 961-5.

Davis, A. J., Sepuri, N. B., Holder, J., Johnson, A. E. y Jensen, R. E. (2000). Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J Cell Biol* **150**, 1271-82.

Del Arco, A. (2005). Novel variants of human SCA_{MC}-3, an isoform of the ATP-Mg/P(i) mitochondrial carrier, generated by alternative splicing from 3'-flanking transposable elements. *Biochem J* **389**, 647-55.

Del Arco, A., Agudo, M. y Satrustegui, J. (2000). Characterization of a second member of the subfamily of calcium-binding mitochondrial carriers expressed in human non-excitable tissues. *Biochem J* **345 Pt 3**, 725-32.

del Arco, A., Morcillo, J., Martinez-Morales, J. R., Galian, C., Martos, V., Bovolenta, P. y Satrustegui, J. (2002). Expression of the aspartate/glutamate mitochondrial carriers aralar1 and citrin during development and in adult rat tissues. *Eur J Biochem* **269**, 3313-20.

del Arco, A. y Satrustegui, J. (1998). Molecular cloning of Aralar, a new member of the mitochondrial carrier superfamily that binds calcium and is present in human muscle and brain. *J Biol Chem* **273**, 23327-34.

del Arco, A. y Satrustegui, J. (2004). Identification of a novel human subfamily of mitochondrial carriers with calcium-binding domains. *J Biol Chem* **279**, 24701-13.

Denton, R. M. y McCormack, J. G. (1986). The calcium sensitive dehydrogenases of vertebrate mitochondria. *Cell Calcium* **7**, 377-86.

Denton, R. M., McCormack, J. G. y Edgell, N. J. (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na⁺, Mg²⁺ and ruthenium red on the Ca²⁺-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. *Biochem J* **190**, 107-17.

DosSantos, R. A., Alfadda, A., Eto, K., Kadowaki, T. y Silva, J. E. (2003). Evidence for a compensated thermogenic defect in transgenic mice lacking the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene. *Endocrinology* **144**, 5469-79.

Duchen, M. R. (1992). Ca(2+)-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J* **283** (Pt 1), 41-50.

Duchen, M. R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* **25**, 365-451.

Duchen, M. R., Surin, A. y Jacobson, J. (2003). Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol* **361**, 353-89.

Editorial. (2003). Whither RNAi? In *Nat Cell Biol*, vol. 5, pp. 489-90.

Eizirik, D. L. y Mandrup-Poulsen, T. (2001). A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* **44**, 2115-33.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. y Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199-213.

Elks, M. L. (1993). Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release. *Endocrinology* **133**, 208-14.

Escriva, F., Gavete, M. L., Fermin, Y., Perez, C., Gallardo, N., Alvarez, C., Andres, A., Ros, M. y Carrascosa, J. M. (2007). Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol* **194**, 131-41.

Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T. et al. (1999). Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* **283**, 981-5.

Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B. y Prentki, M. (2000). Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* **49**, 718-26.

Fernandez-Alvarez, J., Hillaire-Buys, D., Loubatieres-Mariani, M. M., Gomis, R. y Petit, P. (2001). P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. *Pancreas* **22**, 69-71.

Festa, A., Williams, K., D'Agostino, R., Jr., Wagenknecht, L. E. y Haffner, S. M. (2006). The natural course of beta-cell function in nondiabetic and diabetic individuals: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* **55**, 1114-20.

Fiermonte, G., Palmieri, L., Todisco, S., Agrimi, G., Palmieri, F. y Walker, J.

E. (2002). Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* **277**, 19289-94.

Florez, J. C. (2008). Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia* **51**, 1100-10.

Florez, J. C. (2009). The dawn of prospective pharmacogenetic testing in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* **9**, 95-7.

Frayling, T. M. (2007). Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat Rev Genet* **8**, 657-62.

Gallou-Kabani, C., Vige, A., Gross, M. S., Rabes, J. P., Boileau, C., Larue-Achagiotis, C., Tome, D., Jais, J. P. y Junien, C. (2007). C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 1996-2005.

Gembal, M., Gilon, P. y Henquin, J. C. (1992). Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* **89**, 1288-95.

Gilon, P. y Henquin, J. C. (1992). Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca²⁺ concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* **267**, 20713-20.

Gillespie, K. M. (2006). Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Cmaj* **175**, 165-70.

Grabarek, Z. (2006). Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol* **359**, 509-25.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-50.

Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A. y Salter, J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* **567**, 96-102.

Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Karow, M., Blander, G. et al. (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **126**, 941-54.

Hales, C. N. y Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.

Heart, E., Yaney, G. C., Corkey, R. F., Schultz, V., Luc, E., Liu, L., Deeney, J. T., Shirihai, O., Tornheim, K., Smith, P. J. et al. (2007). Ca^{2+} , NAD(P)H and membrane potential changes in pancreatic beta-cells by methyl succinate: comparison with glucose. *Biochem J* **403**, 197-205.

Henquin, J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* **49**, 1751-60.

Henquin, J. C. (2004). Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S48-58.

Hildyard, J. C. y Halestrap, A. P. (2003). Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **374**, 607-11.

Hwang, B., Jeoung, N. M. y Harris, R. A. (2009). Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme (PDHK4) deficiency attenuates the long-term negative effects of a high-saturated fat diet. *Biochem J* **423**, 243-252.

Iossa, S., Mollica, M. P., Lionetti, L., Barletta, A. y Liverini, G. (1995). Hepatic mitochondrial respiration and transport of reducing equivalents in rats fed an energy dense diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* **19**, 539-43.

Ishihara, H., Maechler, P., Gjinovci, A., Herrera, P. L. y Wollheim, C. B. (2003). Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* **5**, 330-5.

Ishihara, H., Wang, H., Drewes, L. R. y Wollheim, C. B. (1999). Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells. *J Clin Invest* **104**, 1621-9.

Iynedjian, P. B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* **293** (Pt 1), 1-13.

Jalil, M. A., Begum, L., Contreras, L., Pardo, B., Iijima, M., Li, M. X., Ramos, M., Marmol, P., Horiuchi, M., Shimotsu, K. et al. (2005). Reduced N-acetylaspartate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *J Biol Chem* **280**, 31333-9.

Jensen, M. V., Joseph, J. W., Ilkayeva, O., Burgess, S., Lu, D., Ronnebaum, S. M., Odegaard, M., Becker, T. C., Sherry, A. D. y Newgard, C. B. (2006). Compensatory responses to pyruvate carboxylase suppression in islet beta-cells. Preservation of glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **281**, 22342-51.

Jensen, M. V., Joseph, J. W., Ronnebaum, S. M., Burgess, S. C., Sherry, A. D. y Newgard, C. B. (2008). Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion.

Am J Physiol Endocrinol Metab **295**, E1287-97.

Jin, H., May, M., Tranebjaerg, L., Kendall, E., Fontan, G., Jackson, J., Subramony, S. H., Arena, F., Lubs, H., Smith, S. et al. (1996). A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet* **14**, 177-80.

Jitrapakdee, S., Vidal-Puig, A. y Wallace, J. C. (2006). Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. *Cell Mol Life Sci* **63**, 843-54.

Joseph, J. W., Jensen, M. V., Ilkayeva, O., Palmieri, F., Alarcon, C., Rhodes, C. J. y Newgard, C. B. (2006). The mitochondrial citrate/isocitrate carrier plays a regulatory role in glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **281**, 35624-32.

Kahn, S. E. (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4047-58.

Kahn, S. E., Hull, R. L. y Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840-6.

Kann, O., Kovacs, R. y Heinemann, U. (2003). Metabotropic receptor-mediated Ca^{2+} signaling elevates mitochondrial Ca^{2+} and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* **90**, 613-21.

Kennedy, E. D., Maechler, P. y Wollheim, C. B. (1998). Effects of depletion of mitochondrial DNA in metabolism secretion coupling in INS-1 cells. *Diabetes* **47**, 374-80.

Kennedy, E. D., Rizzuto, R., Theler, J. M., Pralong, W. F., Bastianutto, C., Pozzan, T. y Wollheim, C. B. (1996). Glucose-stimulated insulin secretion correlates with changes in mitochondrial and cytosolic Ca^{2+} in aequorin-expressing INS-1 cells. *J Clin Invest* **98**, 2524-38.

Kennedy, H. J., Pouli, A. E., Ainscow, E. K., Jouaville, L. S., Rizzuto, R. y Rutter, G. A. (1999). Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem* **274**, 13281-91.

Khan, A., Ling, Z. C. y Landau, B. R. (1996). Quantifying the carboxylation of pyruvate in pancreatic islets. *J Biol Chem* **271**, 2539-42.

Kibbey, R. G., Pongratz, R. L., Romanelli, A. J., Wollheim, C. B., Cline, G. W. y Shulman, G. I. (2007). Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab* **5**, 253-64.

Kirichok, Y., Krapivinsky, G. y Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium

uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360-4.

Kobayashi, K., Sinasac, D. S., Iijima, M., Boright, A. P., Begum, L., Lee, J. R., Yasuda, T., Ikeda, S., Hirano, R., Terazono, H. et al. (1999). The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* **22**, 159-63.

Koehler, C. M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. y Schatz, G. (1999). Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2141-6.

Kunji, E. R. (2004). The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett* **564**, 239-44.

Kunji, E. R. y Robinson, A. J. (2006). The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1237-48.

Kunkel, G. R., Maser, R. L., Calvet, J. P. y Pederson, T. (1986). U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8575-9.

Lameloise, N., Muzzin, P., Prentki, M. y Assimacopoulos-Jeannet, F. (2001). Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* **50**, 803-9.

Lang, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* **259**, 3-17.

Li, G. D., Milani, D., Dunne, M. J., Pralong, W. F., Theler, J. M., Petersen, O. H. y Wollheim, C. B. (1991). Extracellular ATP causes Ca²⁺(+)-dependent and -independent insulin secretion in RINm5F cells. Phospholipase C mediates Ca²⁺ mobilization but not Ca²⁺ influx and membrane depolarization. *J Biol Chem* **266**, 3449-57.

Loubatieres-Mariani, M. M., Chapal, J., Lignon, F. y Valette, G. (1979). Structural specificity of nucleotides for insulin secretory action from the isolated perfused rat pancreas. *Eur J Pharmacol* **59**, 277-86.

Lu, D., Mulder, H., Zhao, P., Burgess, S. C., Jensen, M. V., Kamzolova, S., Newgard, C. B. y Sherry, A. D. (2002). ¹³C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2708-13.

MacDonald, M. J. (1981). High content of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in pancreatic islets and its inhibition by diazoxide. *J Biol Chem* **256**, 8287-90.

MacDonald, M. J. (1982). Evidence for the malate aspartate shuttle in pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* **213**, 643-9.

MacDonald, M. J. (1993a). Estimates of glycolysis, pyruvate (de)carboxylation, pentose phosphate pathway, and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* **305**, 205-14.

MacDonald, M. J. (1993b). Glucose enters mitochondrial metabolism via both carboxylation and decarboxylation of pyruvate in pancreatic islets. *Metabolism* **42**, 1229-31.

MacDonald, M. J. (1993c). Metabolism of the insulin secretagogue methyl succinate by pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* **300**, 201-5.

MacDonald, M. J. (1995). Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* **270**, 20051-8.

Macdonald, M. J. (2003). Export of metabolites from pancreatic islet mitochondria as a means to study anaplerosis in insulin secretion. *Metabolism* **52**, 993-8.

MacDonald, M. J., Fahien, L. A., Brown, L. J., Hasan, N. M., Buss, J. D. y Kendrick, M. A. (2005). Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. In *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 288, pp. E1-15.

Maechler, P., Carobbio, S. y Rubi, B. (2006). In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 696-709.

Maechler, P., Wang, H. y Wollheim, C. B. (1998). Continuous monitoring of ATP levels in living insulin secreting cells expressing cytosolic firefly luciferase. *FEBS Lett* **422**, 328-32.

Maechler, P. y Wollheim, C. B. (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* **402**, 685-9.

Maechler, P. y Wollheim, C. B. (2000). Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell. *J Physiol* **529 Pt 1**, 49-56.

Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F. y Sener, A. (1982). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: effect of aminooxyacetate upon nutrient-stimulated insulin secretion. *Endocrinology* **111**, 392-7.

Marmol, P., Pardo, B., Wiederkehr, A., del Arco, A., Wollheim, C. B. y Satrustegui,

J. (2009). Requirement for aralar and its Ca^{2+} -binding sites in Ca^{2+} signal transduction in mitochondria from INS-1 clonal beta-cells. *J Biol Chem* **284**, 515-24.

Martinez-Serrano, A. y Satrustegui, J. (1992). Regulation of cytosolic free calcium concentration by intrasynaptic mitochondria. *Mol Biol Cell* **3**, 235-48.

Martinez, A., Vitorica, J. y Satrustegui, J. (1988). Cytosolic free calcium levels increase with age in rat brain synaptosomes. *Neurosci Lett* **88**, 336-42.

Mason, T. M., Goh, T., Tchipashvili, V., Sandhu, H., Gupta, N., Lewis, G. F. y Giacca, A. (1999). Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* **48**, 524-30.

Mathis, D., Vence, L. y Benoist, C. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* **414**, 792-8.

Matschinsky, F. M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* **45**, 223-41.

Matschinsky, F. M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S394-404.

McCormack, J. G. (1985). Characterization of the effects of Ca^{2+} on the intramitochondrial Ca^{2+} -sensitive enzymes from rat liver and within intact rat liver mitochondria. *Biochem J* **231**, 581-95.

Mehta, V. y Namboodiri, M. A. (1995). N-acetylaspartate as an acetyl source in the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **31**, 151-7.

Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B. y Maechler, P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* **145**, 667-78.

Miki, T., Nagashima, K., Tashiro, F., Kotake, K., Yoshitomi, H., Tamamoto, A., Gonoi, T., Iwanaga, T., Miyazaki, J. y Seino, S. (1998). Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10402-6.

Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. y Saito, I. (1996). Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1320-4.

Muoio, D. M. y Newgard, C. B. (2008). Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev*

Mol Cell Biol **9**, 193-205.

Navarro-Galve, B., Villa, A., Bueno, C., Thompson, L., Johansen, J. y Martinez-Serrano, A. (2005). Gene marking of human neural stem/precursor cells using green fluorescent proteins. *J Gene Med* **7**, 18-29.

Newgard, C. B. y McGarry, J. D. (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* **64**, 689-719.

Nichols, B. J. y Denton, R. M. (1995). Towards the molecular basis for the regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Mol Cell Biochem* **149-150**, 203-12.

Nicholls, D. G. y Budd, S. L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* **80**, 315-60.

Nicholls, L. I., Ainscow, E. K. y Rutter, G. A. (2002). Glucose-stimulated insulin secretion does not require activation of pyruvate dehydrogenase: impact of adenovirus-mediated overexpression of PDH kinase and PDH phosphate phosphatase in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 1081-8.

Noda, M., Yamashita, S., Takahashi, N., Eto, K., Shen, L. M., Izumi, K., Daniel, S., Tsubamoto, Y., Nemoto, T., Iino, M. et al. (2002). Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the beta-cell model of mitochondrial diabetes. Characteristics of betaHC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription. *J Biol Chem* **277**, 41817-26.

Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., Brandolin, G. y Pebay-Peyroula, E. (2006). Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu Rev Biochem* **75**, 713-41.

Oh, Y. S., Khil, L. Y., Cho, K. A., Ryu, S. J., Ha, M. K., Cheon, G. J., Lee, T. S., Yoon, J. W., Jun, H. S. y Park, S. C. (2008). A potential role for skeletal muscle caveolin-1 as an insulin sensitivity modulator in ageing-dependent non-obese type 2 diabetes: studies in a new mouse model. *Diabetologia* **51**, 1025-34.

Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* **447**, 689-709.

Palmieri, L., Pardo, B., Lasorsa, F. M., del Arco, A., Kobayashi, K., Iijima, M., Runswick, M. J., Walker, J. E., Saheki, T., Satrustegui, J. et al. (2001). Citrin and aralar1 are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *Embo J* **20**, 5060-9.

Palmieri, L., Runswick, M. J., Fiermonte, G., Walker, J. E. y Palmieri, F. (2000). Yeast mitochondrial carriers: bacterial expression, biochemical identification and metabolic

significance. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 67-77.

Panten, U., Schwanstecher, M., Wallasch, A. y Lenzen, S. (1988). Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **338**, 459-62.

Paolisso, G., Gambardella, A., Amato, L., Tortoriello, R., D'Amore, A., Varricchio, M. y D'Onofrio, F. (1995). Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* **38**, 1295-9.

Pardo, B., Contreras, L., Serrano, A., Ramos, M., Kobayashi, K., Iijima, M., Saheki, T. y Satrustegui, J. (2006). Essential role of aralar in the transduction of small Ca²⁺ signals to neuronal mitochondria. *J Biol Chem* **281**, 1039-47.

Paschen, S. A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M. F., Neupert, W. y Brunner, M. (2000). The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J* **19**, 6392-400.

Patane, G., Anello, M., Piro, S., Vigneri, R., Purrello, F. y Rabuazzo, A. M. (2002). Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition. *Diabetes* **51**, 2749-56.

Patterson, G. H., Knobel, S. M., Arkhammar, P., Thastrup, O. y Piston, D. W. (2000). Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5203-7.

Persengiev, S. P., Zhu, X. y Green, M. R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *Rna* **10**, 12-8.

Piston, D. W. y Knobel, S. M. (1999a). Quantitative imaging of metabolism by two-photon excitation microscopy. *Methods Enzymol* **307**, 351-68.

Piston, D. W. y Knobel, S. M. (1999b). Real-time Analysis of Glucose Metabolism by Microscopy. *Trends Endocrinol Metab* **10**, 413-417.

Pongratz, R. L., Kibbey, R. G., Shulman, G. I. y Cline, G. W. (2007). Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *J Biol Chem* **282**, 200-7.

Prentki, M. (1996). New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* **134**, 272-86.

Prentki, M. y Matschinsky, F. M. (1987). Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* **67**, 1185-248.

Prentki, M., Vischer, S., Glennon, M. C., Regazzi, R., Deeney, J. T. y Corkey, B. E. (1992). Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* **267**, 5802-10.

Produit-Zengaffinen, N., Davis-Lameloise, N., Perreten, H., Becard, D., Gjinovci, A., Keller, P. A., Wollheim, C. B., Herrera, P., Muzzin, P. y Assimacopoulos-Jeannet, F. (2007). Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia* **50**, 84-93.

Rizzuto, R., Brini, M., Bastianutto, C., Marsault, R. y Pozzan, T. (1995). Photoprotein-mediated measurement of calcium ion concentration in mitochondria of living cells. *Methods Enzymol* **260**, 417-28.

Robinson, A. J. y Kunji, E. R. (2006). Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2617-22.

Rocheleau, J. V., Head, W. S., Nicholson, W. E., Powers, A. C. y Piston, D. W. (2002). Pancreatic islet beta-cells transiently metabolize pyruvate. *J Biol Chem* **277**, 30914-20.

Roesch, K., Hynds, P. J., Varga, R., Tranebjaerg, L. y Koehler, C. M. (2004). The calcium-binding aspartate/glutamate carriers, citrin and aralar1, are new substrates for the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet* **13**, 2101-11.

Ronnebaum, S. M., Ilkayeva, O., Burgess, S. C., Joseph, J. W., Lu, D., Stevens, R. D., Becker, T. C., Sherry, A. D., Newgard, C. B. y Jensen, M. V. (2006). A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **281**, 30593-602.

Rorsman, P. (1997). The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* **40**, 487-95.

Rorsman, P. y Renstrom, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**, 1029-45.

Rubi, B., del Arco, A., Bartley, C., Satrustegui, J. y Maechler, P. (2004). The malate-aspartate NADH shuttle member Aralar1 determines glucose metabolic fate, mitochondrial activity, and insulin secretion in beta cells. *J Biol Chem* **279**, 55659-66.

Rubi, B., Ishihara, H., Hegardt, F. G., Wollheim, C. B. y Maechler, P. (2001). GAD65-mediated glutamate decarboxylation reduces glucose-stimulated insulin secretion

in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **276**, 36391-6.

Ruiz, F., Alvarez, G., Pereira, R., Hernandez, M., Villalba, M., Cruz, F., Cerdan, S., Bogonez, E. y Satrustegui, J. (1998). Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* **9**, 1277-82.

Rutter, G. A., Pralong, W. F. y Wollheim, C. B. (1992). Regulation of mitochondrial glycerol-phosphate dehydrogenase by Ca^{2+} within electropermeabilized insulin-secreting cells (INS-1). *Biochim Biophys Acta* **1175**, 107-13.

Rutter, G. A., Theler, J. M., Murgia, M., Wollheim, C. B., Pozzan, T. y Rizzuto, R. (1993). Stimulated Ca^{2+} influx raises mitochondrial free Ca^{2+} to supramicromolar levels in a pancreatic beta-cell line. Possible role in glucose and agonist-induced insulin secretion. *J Biol Chem* **268**, 22385-90.

Saberi, M., Bjelica, D., Schenk, S., Imamura, T., Bandyopadhyay, G., Li, P., Vargeese, C., Wang, W., Bowman, K., Zhang, Y., et al. (2009). Novel liver-specific TORC2 siRNA corrects hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* In Press

Saheki, T., Iijima, M., Li, M. X., Kobayashi, K., Horiuchi, M., Ushikai, M., Okumura, F., Meng, X. J., Inoue, I., Tajima, A. et al. (2007). Citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. *J Biol Chem* **282**, 25041-52.

Sak, K. y Webb, T. E. (2002). A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch Biochem Biophys* **397**, 131-6.

Sako, Y. y Grill, V. E. (1990). A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* **127**, 1580-9.

Santini, E., Cuccato, S., Madec, S., Chimenti, D., Ferrannini, E. y Solini, A. (2009). Extracellular adenosine 5'-triphosphate modulates insulin secretion via functionally active purinergic receptors of X and Y subtype. *Endocrinology* **150**, 2596-602.

Sanz, R., del Arco, A., Ayuso, C., Ramos, C. y Satrustegui, J. (2000). Assignment of the calcium-binding mitochondrial carrier Aralar1 gene (SLC25A12) to human chromosome band 2q31 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 143-4.

Saraste, M. y Walker, J. E. (1982). Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett* **144**, 250-4.

Sato, Y., Aizawa, T., Komatsu, M., Okada, N. y Yamada, T. (1992). Dual functional role of membrane depolarization/ Ca^{2+} influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* **41**, 438-43.

Satrústegui, J., Pardo, B. y Del Arco, A. (2007). Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev* **87**, 29-67.

Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T. y Prentki, M. (1997). Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* **272**, 18572-9.

Seghers, V., Nakazaki, M., DeMayo, F., Aguilar-Bryan, L. y Bryan, J. (2000). Sur1 knockout mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* **275**, 9270-7.

Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L. J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M. J., Wollheim, C. B. et al. (1994). Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* **269**, 4895-902.

Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N. y Fesik, S. W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6347-52.

Sener, A., Kawazu, S., Hutton, J. C., Boschero, A. C., Devis, G., Somers, G., Herchuelz, A. y Malaisse, W. J. (1978). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of exogenous pyruvate on islet function. *Biochem J* **176**, 217-32.

Sener, A., Rasschaert, J. y Malaisse, W. J. (1990). Hexose metabolism in pancreatic islets. Participation of Ca²⁺(+)-sensitive 2-ketoglutarate dehydrogenase in the regulation of mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* **1019**, 42-50.

Shi, Y., Kanaani, J., Menard-Rose, V., Ma, Y. H., Chang, P. Y., Hanahan, D., Tobin, A., Grodsky, G. y Baekkeskov, S. (2000). Increased expression of GAD65 and GABA in pancreatic beta-cells impairs first-phase insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E684-94.

Shiota, M., Postic, C., Fujimoto, Y., Jetton, T. L., Dixon, K., Pan, D., Grimsby, J., Grippio, J. F., Magnuson, M. A. y Cherrington, A. D. (2001). Glucokinase gene locus transgenic mice are resistant to the development of obesity-induced type 2 diabetes. *Diabetes* **50**, 622-629.

Shuttleworth, C. W., Brennan, A. M. y Connor, J. A. (2003). NAD(P)H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices. *J Neurosci* **23**, 3196-208.

Sinasac, D. S., Moriyama, M., Jalil, M. A., Begum, L., Li, M. X., Iijima, M., Horiuchi, M., Robinson, B. H., Kobayashi, K., Saheki, T. et al. (2004). Slc25a13-

knockout mice harbor metabolic deficits but fail to display hallmarks of adult-onset type II citrullinemia. *Mol Cell Biol* 24, 527-36.

Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S. et al. (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881-5.

Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A. y Smith, S. R. (2005). A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54, 1926-33.

Stark, R., Pasquel, F., Turcu, A., Pongratz, R. L., Roden, M., Cline, G. W., Shulman, G. I. y Kibbey, R. G. (2009). Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial pepck links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *J Biol Chem*.

Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W. C. y Shi, Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5515-20.

Theler, J. M., Mollard, P., Guerineau, N., Vacher, P., Pralong, W. F., Schlegel, W. y Wollheim, C. B. (1992). Video imaging of cytosolic Ca²⁺ in pancreatic beta-cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP. *J Biol Chem* 267, 18110-7.

Traba, J., Froschauer, E. M., Wiesenberger, G., Satrustegui, J. y Del Arco, A. (2008). Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi carrier Sal1p, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose. *Mol Microbiol* 69, 570-85.

Traba, J., Satrustegui, J. y del Arco, A. (2009a). Characterization of SCA_{MC}-3-like/slc25a41, a novel calcium-independent mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier. *Biochem J* 418, 125-33.

Traba, J., Satrustegui, J. y del Arco, A. (2009b). Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/Pi carrier. *Mitochondrion* 9, 79-85.

Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R. E., May, M., Arena, F., Barker, D. et al. (1995). A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet* 32, 257-63.

Voronina, S., Sukhomlin, T., Johnson, P. R., Erdemli, G., Petersen, O. H. y Tepikin, A. (2002). Correlation of NADH and Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol* 539, 41-52.

Weir, G. C. y Bonner-Weir, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S16-21.

Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M. y Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **104**, 787-94.

Wibom, R., Lasorsa, F. M., Tohonen, V., Barbaro, M., Sterky, F. H., Kucinski, T., Naess, K., Jonsson, M., Pierri, C. L., Palmieri, F. et al. (2009). AGC1 deficiency associated with global cerebral hypomyelination. *N Engl J Med* **361**, 489-95.

Wiederkehr, A., Park, K. S., Dupont, O., Demaurex, N., Pozzan, T., Cline, G. W. y Wollheim, C. B. (2009). Matrix alkalization: a novel mitochondrial signal for sustained pancreatic beta-cell activation. *EMBO J* **28**, 417-28.

Wiederkehr, A. y Wollheim, C. B. (2006). Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* **147**, 2643-9.

Wiederkehr, A. y Wollheim, C. B. (2008). Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* **44**, 64-76.

Winzell, M. S., Holm, C. y Ahren, B. (2003). Downregulation of islet hormone-sensitive lipase during long-term high-fat feeding. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 273-8.

Wollheim, C. B. (2000). Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. *Diabetologia* **43**, 265-77.

Wollheim, C. B. y Maechler, P. (2002). Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S37-42.

Yang, S. J., Huh, J. W., Kim, M. J., Lee, W. J., Kim, T. U., Choi, S. Y. y Cho, S. W. (2003). Regulatory effects of 5'-deoxypyridoxal on glutamate dehydrogenase activity and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochimie* **85**, 581-6.

Yasuda, T., Yamaguchi, N., Kobayashi, K., Nishi, I., Horinouchi, H., Jalil, M. A., Li, M. X., Ushikai, M., Iijima, M., Kondo, I. et al. (2000). Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet* **107**, 537-45.

Zambrowicz, B. P., Friedrich, G. A., Buxton, E. C., Lilleberg, S. L., Person, C. y Sands, A. T. (1998). Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* **392**, 608-11.

Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., Timpson, N. J., Perry, J. R., Rayner, N. W., Freathy, R. M. *et al.* (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316, 1336-41.

Zhao, C., Wilson, M. C., Schuit, F., Halestrap, A. P. y Rutter, G. A. (2001). Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes* **50**, 361-6.

Zhou, Y. P. y Grill, V. (1995). Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 1584-90.

Zhou, Y. P. y Grill, V. E. (1994). Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* **93**, 870-6.

